

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75308 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12, (30) Angaben zur Priorität:
C07K 14/435, C12N 15/62 199 26 068.0 8. Juni 1999 (08.06.1999) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01873 (71) Anmelder und
(72) Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juni 2000 (08.06.2000) US): SKERRA, Arne [DE/DE]; Max-Lehner-Str. 18,
D-85354 Freising (DE).

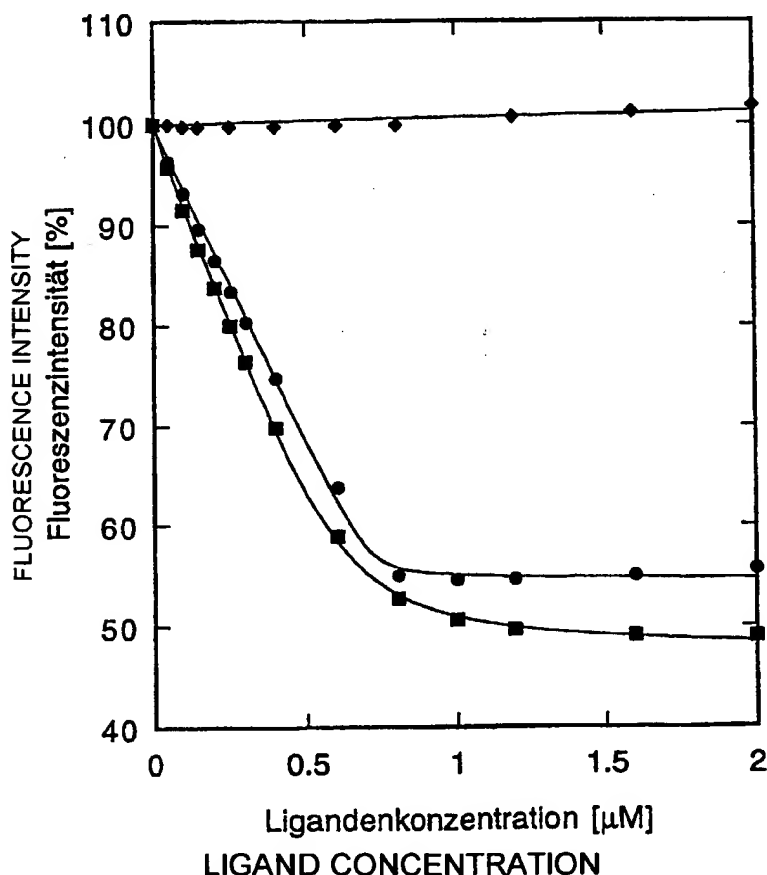
(25) Einreichungssprache: Deutsch (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHLEHUBER, Steffen [DE/DE]; Murstr. 21, D-85356 Freising (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MUTEINS OF BILIN-BINDING PROTEIN

(54) Bezeichnung: MUTEINE DES BILIN-BINDUNGSPROTEINS



(57) Abstract: The invention relates to muteins of bilin-binding protein with a binding ability to digoxigenin and the fusion proteins of said muteins, a method for preparing said muteins and fusion proteins thereof and to their utilization for detecting or binding digoxigenin-labeled biomolecules. The invention especially relates to a polypeptide selected from the muteins of the bilin-binding protein, which is characterized in that (a) it can bind digoxigenin or digoxigenin conjugates; (b) it does not bind ouabain, testosterone and 4-aminofluorescein (c) at least one of the sequence positions 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 and 127 of the bilin-binding protein has an aminoacid substitution. Due to their simple molecular structure, the inventive muteins provide advantages for production and utilization in comparison with antibodies against the digoxigenin group.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 00/75308 A1



(74) **Anwalt:** VIERING, JENTSCHURA & PARTNER;
Steinsdorfstr. 6, D-80538 München (DE).

Veröffentlicht:

- *Mit internationalem Recherchenbericht.*
- *Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.*

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AU, CA, JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung bezieht sich auf Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag, (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen (28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127) des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist. Aufgrund ihres einfachen molekularen Aufbaus weisen der erfindungsgemässen Muteine bei Herstellung und Verwendung Vorteile im Vergleich zu Antikörpern gegen die Digoxigeningruppe auf.

Muteine des Bilin-Bindungsproteins

Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen.

Die Digoxigeningruppe ist ein heute in der Molekularbiologie weit verbreitetes Instrument für den nichtradioaktiven Nachweis von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Biomolekülen. Zu diesem Zweck wird das Biomolekül mit einem reaktiven Derivat des Digoxigenins meist kovalent modifiziert, was den anschließenden Nachweis des Moleküls mit einem gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörper, bzw. einem Konjugat aus einem entsprechenden Antikörperfragment und einem Reporterenzym, gemäß in der Biochemie allgemein üblichen Methoden gestattet.

Dem Fachmann sind eine ganze Reihe von reaktiven Digoxigeninderivaten bekannt, die teilweise auch kommerziell erhältlich sind. Beispielsweise eignen sich Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (DIG-NHS), Digoxigenin-3-O-succinyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester und 3-Amino-3-desoxydigoxigenin-hemisuccinamid-succinimidylester zur kovalenten Kopplung mit Proteinen, insbesondere mit den Aminogruppen von exponierten Lysinseitenketten. Mit 3-Iodacetyl-amino-3-desoxydigoxigenin lassen sich vor allem Thiolgruppen in Proteinen oder anderen Biomolekülen selektiv mit der Digoxigeningruppe markieren. Synthetische Oligodesoxy-nukleotide können mit denselben reaktiven Digoxigeninderivaten gekoppelt werden, sofern sie im Verlauf der Synthese mit geeigneten freien Amino- oder Thiolgruppen versehen wurden.

Zur direkten Markierung von Nukleinsäuren eignen sich zudem cis-Platinkomplexe von Digoxigeninderivaten (DIG Chem-Link

- Reagent) oder Carbodiimidgruppen enthaltende Digoxigeninderivate (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 806 431 A2). Alternativ ist es im Fall von Desoxyribonukleinsäuren möglich, diese im Verlauf
- 5 einer matrizenabhängigen enzymatischen Synthese unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase und eines mit der Digoxigeningruppe gekoppelten Desoxynukleosidtriphosphats, z.B. Digoxigenin-11-dUTP, Digoxigenin-11-ddUTP oder Digoxigenin-16-dATP, zu markieren. Analog eignet sich Digoxigenin-11-UTP zum
- 10 Einbau in enzymatisch synthetisierte RNA. Darüber hinaus können Oligodesoxynukleotide direkt bei der automatisierten DNA-Synthese unter Einsatz geeigneter aktivierter Bausteine, z.B. sogenannter "Virtual Nucleotides", mit der Digoxigeningruppe markiert werden. Derartige mit der Digoxigeningruppe gekoppelte
- 15 Nukleinsäuren eignen sich als nichtradioaktive Sonden zum Nachweis komplementärer Nukleotidsequenzen durch Hybridisierung, z.B. in Northern oder Southern Blots (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 324 474 A1).
- 20 Mit der Digoxigeningruppe markierte Proteine oder Glycoproteine sind insbesondere von Nutzen, um beispielsweise entsprechende Antigene bzw. dagegen gerichtete Antikörper in immunchemischen Testverfahren wie ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) zu bestimmen. Der eigentliche Nachweis des mit der
- 25 Digoxigeningruppe konjugierten Biomoleküls erfolgt normalerweise mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, in der Regel in der Form eines Konjugats aus dem Fab-Fragment dieses Antikörpers mit einem geeigneten Enzym, wie z.B. der Alkalischen Phosphatase oder der Meerrettich-
- 30 Peroxidase, als Markierung. Die enzymatische Aktivität dient anschließend zur Quantifizierung durch Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder chemolumineszenten Reaktion. Verschiedene Antikörper gegen die Digoxigeningruppe sind bekannt (Mudgett-Hunter et al., J. Immunol. 129 (1982), 1165-
- 35 1172; Jeffrey et al., J. Mol. Biol. 248 (1995), 344-360).

Die Verwendung von Antikörpern hat jedoch mehrere Nachteile. So ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Hybridom-

zellkulturen aufwendig, und die Proteolyse zum Fab-Fragment sowie die Produktion von Konjugaten mit Reporterenzymen erfordert zusätzliche schwierige Verfahrensschritte. Aber selbst die gentechnische Gewinnung von Antikörpern ist nicht
5 einfach, was hauptsächlich darin begründet ist, daß sich Antikörper wie auch deren antigenbindende Fragmente in strukturell komplizierter Weise aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzen. Bei der gentechnischen Manipulation von Antikörpern müssen deshalb zwei Gene
10 gleichzeitig gehandhabt werden. Außerdem ist die Ausbeute an korrekt gefalteten Antikörperfragmenten bei deren gentechnischer Produktion häufig gering. Wie dem Fachmann bekannt ist, gilt dies umso mehr, wenn rekombinante Fusionsproteine aus Fab-Fragmenten von Antikörpern und Enzymen
15 hergestellt werden sollen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, alternative Polypeptid-Reagenzien zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe zu entwickeln, welche sich auf einfache Weise produzieren lassen.

20

In einem evolutiven Forschungsansatz wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß sich Muteine des strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten Bilin-Bindungsproteins (Schmidt und Skerra, Eur. J. Biochem.
25 219 (1994), 855-863) eignen, um die Digoxigenin-Gruppe durch Bindung mit hoher Affinität nachzuweisen, wobei die Erkennung des Digoxigenins erstaunlich selektiv gegenüber anderen Steroiden erfolgt.

30 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es
(a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
35 (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
(c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des

Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

Bevorzugt sind dabei Digoxigenin bindende Muteine, die an
zumindest 4 bis 7 oder vorzugsweise zumindest 8 bis 12 der
vorstehend definierten Sequenzpositionen eine
Aminosäuresubstitution aufweisen. Ein besonders bevorzugtes
Mutein ist das Polypeptid, das die in SEQ ID NO. 15
dargestellte Aminosäuresequenz besitzt.

Außerhalb des Bereichs der Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35,
36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127
können die Muteine der vorliegenden Erfindung der
Aminosäuresequenz des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris
brassicae* entsprechen. Andererseits kann die Aminosäuresequenz
der erfindungsgemäßen Polypeptide auch außerhalb der genannten
Positionen Unterschiede zum Bilin-Bindungsprotein aufweisen.
Derartige Varianten der Sequenz des Bilin-Bindungsproteins
umfassen natürlich vorkommende sowie künstlich erzeugte
Varianten, und unter den Abweichungen werden Substitutionen,
Insertionen, Deletionen von Aminosäureresten sowie N- und/oder
C-terminale Additionen verstanden.

Z. B. können die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-
Bindungsproteins Aminosäuresubstitutionen aufweisen, welche
eine Oligomerisierung des Bilin-Bindungsproteins vermeiden, wie
die Substitution Asn(1)->Asp, oder um eine proteolytische
Spaltung innerhalb der Polypeptidkette zu unterdrücken, die bei
der Produktion in *E. coli* auftreten kann, z.B. durch die
Substitution Lys(87)->Ser. Weiterhin können in die für die
Muteine des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure die
Mutationen Asn(21)->Gln und Lys(135)->Met eingeführt werden, um
beispielsweise die Klonierung eines Genabschnitts über zwei
neue *Bst*XI-Restriktions-schnittstellen an diesen Positionen zu
erleichtern. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die
gezielte Einführung von Aminosäuresubstitutionen innerhalb oder
außerhalb der genannten Positionen, um ganz allgemein bestimmte
Eigenschaften des erfindungsgemäßen Muteins zu verbessern, z.B.
seine Faltungsstabilität oder -effizienz oder seine

Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen.

- Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide, Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden, kann durch übliche
5 Verfahren, z.B. ELISA, Fluoreszenztitration, Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen oder Blotting-Verfahren, beispielsweise Western-Blotting, Southern-Blotting oder Northern-Blotting, bestimmt werden. Blotting-Methoden können verwendet werden, um Konjugate des Digoxigenins
10 mit Proteinen oder Nukleinsäuren auf eine Membran zu transferieren und diese anschließend mit einem der erfindungsgemäßen Muteine, einem Konjugat dieses Muteins oder einem Fusionsprotein dieses Muteins nachzuweisen.
- 15 Eine quantitative Kenngröße für die Bindungsaffinität liefern etablierte thermodynamische Parameter, wie etwa die Affinitätskonstante oder die Dissoziationskonstante für den Komplex aus dem Mutein und dem gebundenen Liganden, z.B. Digoxigenin. Aber auch eine qualitative Bestimmung der
20 Bindungsfähigkeit ist möglich, z.B. anhand der Intensität eines Bindungssignals aufgrund einer chromogenen Reaktion bzw. eines Farbniederschlags, welcher mit Hilfe einer der genannten Blotting-Methoden erhalten wird.
- 25 Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine sind in einem zweistufigen evolutiven Prozeß erhältlich. Die Zufallsmutagenese des Bilin-Bindungsproteins an mindestens einer, bevorzugt an zumindest 4 bis 7, und besonders bevorzugt an zumindest 8 bis 12 der
30 Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 und die nachfolgende einfache oder vorzugsweise wiederholte Selektion von Muteinen mit Affinität zur Digoxigeningruppe aus dieser Bibliothek, wobei vorzugsweise freies Digoxigenin oder Digitoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird, liefert Muteine des
35 Bilin-Bindungsproteins, die die Digoxigeningruppe erkennen, wobei aber die Affinität noch vergleichsweise niedrig ist. Die erneute Mutagenese eines solchen Muteins an zumindest einer, vorzugsweise zumindest 3 oder 4, oder an allen der

Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37, nun gefolgt von einer einfachen oder vorzugsweise wiederholten Anreicherung durch Komplexbildung mit der Digoxigenin-Gruppe und anschließender Dissoziation des gebildeten Komplexes im sauren oder basischen Milieu, führt daraufhin zur Gewinnung von Muteinen mit wesentlich höherer Affinität zur Digoxigenin-Gruppe. Bei dieser Anreicherung liegt die Digoxigenin-Gruppe vorzugsweise als Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat vor.

10

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Affinitätskonstante zwischen solchen erfindungsgemäßen Polypeptiden und Digoxigenin mindestens 10^7 M^{-1} beträgt. Anders ausgedrückt heißt dies, daß die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist. Einzelne Exemplare zeigen sogar Dissoziationskonstanten von 35 nM oder kleiner, wie in den Beispielen ausgeführt ist.

15

Neben dem Digoxigenin können von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins auch Derivate des Digoxigenins als Ligand gebunden werden, z.B. Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin. Weiterhin können Konjugate dieser chemischen Verbindungen, d. h. mit Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin kovalent oder über einen Metallkomplex verknüpfte Nukleinsäuren, Polypeptide, Kohlenhydrate, andere natürliche oder synthetische Biomoleküle, Makromoleküle oder niedermolekulare Verbindungen, von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins gebunden werden.

25

Vorzugsweise werden zur Herstellung solcher Konjugate die dem Fachmann bekannten reaktiven Derivate von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin eingesetzt, wie sie beispielsweise weiter oben angegeben sind.

30

Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine, welche durch den beschriebenen zweistufigen Prozeß gewonnen wurden, zeigen im Vergleich zu Digoxigenin eine noch höhere Affinität zu Digitoxin oder Digitoxigenin, deren Steroidsystem sich bloß

35

durch das Fehlen einer Hydroxygruppe von dem des Digoxigenins unterscheidet. Überraschenderweise zeigen diese Muteine eine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf die Digoxigenin- bzw. Digitoxigeningruppe, was sich darin ausdrückt, daß andere
5 Steroide oder Steroidgruppen wie Ouabain oder Testosteron mit sehr viel geringerer Affinität, falls überhaupt, gebunden werden. Auch Derivate des Fluoresceins, wie 4-Aminofluorescein, werden offensichtlich nicht gebunden. Damit ist gemeint, daß Ouabain, Testosteron oder 4-Aminofluorescein jeweils eine
10 Dissoziationskonstante von mindestens 10 μM , bevorzugt mindestens 100 μM , gegenüber den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins aufweisen.

In dieser Spezifitätseigenschaft unterscheiden sich diese
15 Muteine erheblich von anderen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins sowie von gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörpern, wie z.B. dem Antikörper 26-10 (Chen et al., Protein Eng. 12 (1999), 349-356), welcher Ouabain mit beträchtlicher Affinität bindet, was den erfindungsgemäßen
20 Muteinen des Bilin-Bindungsproteins einen besonderen Vorteil verleiht. Es ist überraschend, daß gerade die zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 zu den bevorzugten Muteinen des Bilin-Bindungsproteins führen. Bevorzugt sind daher solche Muteine, die mindestens
25 eine, vorzugsweise mindestens 3 oder 4 oder alle der Aminosäuresubstitutionen Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile und Glu(37)->Thr tragen.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Muteine tragen mindestens
30 eine, mindestens 4 bis 7, oder vorzugsweise mindestens 8 bis 12 der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly,
35 Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein. Bei der gewählten Schreibweise ist jeweils zunächst die Aminosäure in dem natürlichen Bilin-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-

Zugriffscode P09464) zusammen mit der Sequenzposition für das mature Polypeptid in Klammern angegeben, und die entsprechende Aminosäure in einem erfindungsgemäßen Mutein ist nach dem Pfeil genannt. Nochmals besonders bevorzugte Muteine gemäß dieser
5 Erfindung tragen alle der genannten Aminosäuresubstitutionen.

Es ist überraschend, daß die Position 93 des Bilin-Bindungsproteins in den erfindungsgemäßen Muteinen nicht verändert ist, obwohl auch diese Aminosäure von der Mutagenese
10 zur Herstellung der Zufallsbibliothek betroffen war. Bevorzugte Muteine des Bilin-Bindungsproteins tragen daher an dieser Position die Aminosäure Val.

Für bestimmte Nachweisverfahren ist es günstig, die Muteine des
15 Bilin-Bindungsproteins der vorliegenden Erfindung in markierter Form zu verwenden. Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es zumindest eine Markierung trägt. Geeignete Markierungsgruppen sind dem Fachmann bekannt und
20 umfassen Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumineszenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold. Ganz allgemein ist die Markierung mit Substanzen bzw. Enzymen möglich, die in einer chemischen oder
25 enzymatischen Reaktion einen bestimmbaren Stoff erzeugen. Dabei können alle für Antikörper bekannten Markierungen auch an die erfindungsgemäßen Muteine gekoppelt werden.

Eine für die praktische Anwendung besonders vorteilhafte
30 Möglichkeit besteht darin, die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins in der Form von Fusionsproteinen zu verwenden. Techniken zur Herstellung solcher Fusionsproteine mittels gentechnischer Methoden sind dem Fachmann bekannt. Geeignete Fusionspartner für die erfindungsgemäßen Muteine
35 wären Enzyme und andere Polypeptide, Proteine oder Proteindomänen. Derartige Fusionen wären geeignet, um dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins zusätzliche Eigenschaften zu vermitteln, wie z.B. enzymatische Aktivität oder Affinität zu

anderen Molekülen, wie Proteinen, Makromolekülen oder niedermolekularen Liganden.

Beispielsweise sind Fusionen mit Enzymen, welche chromogene
5 oder fluorogene Reaktionen katalysieren oder zur Freisetzung
von cytotoxischen Agenzien dienen können, möglich. Weitere
Beispiele für Fusionspartner, die in der Praxis von Vorteil
sein können, sind Bindungsdomänen wie die Albumin-
Bindungsdomäne oder die Immunglobulin-Bindungsdomäne von
10 Protein G oder Protein A, Antikörperfragmente,
Oligomerisierungsdomänen, Toxine oder andere Bindungsproteine
und deren funktionelle Bestandteile sowie Affinitätspeptide,
wie z.B. das Strep-Tag oder das Strep-Tag II (Schmidt et al.,
J. Mol. Biol. 255 (1996), 753-766). Auch Proteine mit
15 besonderen chromogenen oder fluorogenen Eigenschaften, wie z.B.
das grün fluoreszierende Protein, eignen sich als
Fusionspartner. Weiterhin käme das Hüllprotein III eines
filamentösen Bakteriophagen, wie M13, f1 oder fd, oder ein
Fragment dieses Hüllproteins als Fusionspartner in Frage.

20 Unter dem Begriff Fusionsproteine sollen hier ganz allgemein
auch solche erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-
Bindungsproteins verstanden werden, die mit einer Signalsequenz
ausgestattet sind. Signalsequenzen am N-Terminus des
25 erfindungsgemäßen Polypeptids können dazu dienen, dieses bei
der Biosynthese in ein bestimmtes Zellkompartiment, z.B. das
Periplasma von *E. coli* oder das Lumen des Endoplasmatischen
Retikulums einer eukaryontischen Zelle, bzw. in das die Zelle
umgebende Medium zu dirigieren. Dabei wird die Signalsequenz
30 normalerweise von einer Signalpeptidase abgespalten. Außerdem
können andere Signal- bzw. Targeting-Sequenzen verwendet
werden, die nicht unbedingt am N-Terminus des Polypeptids
angebracht sein müssen, und die dessen Lokalisierung in
speziellen Zellkompartimenten ermöglichen. Eine bevorzugte
35 Signalsequenz zur Sekretion in das Periplasma von *E. coli* ist
die OmpA-Signalsequenz. Weitere Signalsequenzen sowie
Targeting-Sequenzen sind im Stand der Technik in großer Zahl
bekannt.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins besteht darin, daß sich sowohl deren N-Terminus als auch deren C-Terminus zur Herstellung von Fusionsproteinen eignet. Im Gegensatz zu Antikörpern, bei denen
5 sich der N-Terminus sowohl der leichten als auch der schweren Immunglobulinkette in räumlicher Nähe zur Antigenbindungsstelle befinden, können bei den erfindungsgemäßen Polypeptiden beide Enden der Polypeptidkette zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, ohne daß die Bindung des Liganden
10 beeinträchtigt wird.

Ein Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein
15 anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminal des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist. Ein nochmals weiterer Gegenstand der Erfindung sind Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins oder von Fusionsproteinen mit dem Aminoterminal von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins,
20 wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

25 Ein bevorzugtes Enzym zur Konstruktion der erfindungsgemäßen Fusionsproteine ist die bakterielle Alkalische Phosphatase (Sowadski et al., J. Mol. Biol. 186 (1985) 417-433). Diese kann einerseits am N-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins oder am C-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins angebracht sein. Zusätzlich kann ein solches
30 Fusionsprotein eine Signalsequenz tragen, wie z.B. OmpA oder PhoA, die dessen Sekretion in das Periplasma von *E. coli* bewirkt, wo sich die Disulfidbindungen in der Polypeptidkette effizient ausbilden können. Weiterhin kann es mit einem
35 Affinitätspeptid ausgestattet sein, wie z.B. dem Strep-Tag II, welches dessen einfache Reinigung erlaubt. Spezifische erfindungsgemäße Fusionsproteine sind in den Beispielen beschrieben. Ein Vorteil eines derartigen Fusionsproteins

besteht darin, daß es direkt eine chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Nachweisreaktion katalysieren kann, was seinen Einsatz zur Detektion der Digoxigeningruppe vereinfacht.

5 Ein weiterer Vorteil der Verwendung der Alkalischen Phosphatase zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine besteht darin, daß dieses Enzym zu einem stabilen Homodimer assoziiert und demzufolge dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins als Bestandteil des Fusionsproteins die Eigenschaft der Bivalenz
10 verleiht. Auf diese Weise kann bei der Bindung der Digoxigeningruppe ein Aviditätseffekt resultieren, der die Nachweisempfindlichkeit steigert. Ein solcher Aviditätseffekt ist insbesondere zu erwarten, wenn das mit Digoxigenin markierte Molekül an einer festen Phase adsorbiert ist, in
15 oligomerer bzw. membrangebundener Form vorliegt oder mit mehreren Digoxigeningruppen konjugiert ist. Andere homodimere Enzyme eignen sich analog zur Herstellung bivalenter Fusionsproteine mit den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins.

20 Abgesehen von der bakteriellen Alkalische Phosphatase können auch Phosphatasen aus eukaryontischen Organismen, wie z.B. die kalbsintestinale Phosphatase (CIP), zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwendet werden. Diese
25 zeichnen sich oftmals durch höhere enzymatische Aktivität aus (Murphy und Kantrowitz; Mol. Microbiol. 12 (1994), 351-357), was eine größere Nachweisempfindlichkeit bewirken kann. Auch Mutanten der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit verbesserter katalytischer Aktivität (Mandecki et al., Protein
30 Eng. 4 (1991), 801-804) lassen sich zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwenden. Weiterhin eignen sich andere dem Fachmann bekannte Enzyme, welche chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Reaktionen katalysieren, wie z.B. die β -Galactosidase oder die Meerrettich-Peroxidase, zur
35 Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine. All diese Enzyme können darüber hinaus ebenso zur Markierung von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins eingesetzt werden, indem sie z.B. unter Verwendung üblicher Kopplungsreagenzien mit dem separat

gewonnenen Mutein oder einem Fusionsprotein des Muteins konjugiert werden.

Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung
5 eine Nukleinsäure, die eine für ein Mutein oder ein
Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins
kodierende Sequenz umfaßt. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil
eines Vektors sein, auf dem eine operativ funktionelle Umgebung
zur Expression der Nukleinsäure gegeben ist. Geeignete Vektoren
10 sind in großer Zahl aus dem Stand der Technik bekannt und
werden hierin nicht ausführlich beschrieben. Unter einer
operativ funktionellen Umgebung werden solche Elemente
verstanden, die die Transkription und/oder nachfolgende
Prozessierung einer mRNA ermöglichen, begünstigen, erleichtern
15 und/oder erhöhen. Beispiele für derartige Elemente sind etwa
Promotoren, Enhancer, Transkriptionsinitiationsstellen und -
terminationsstellen, Translationsinitiationsstellen,
Polyadenylierungssignale etc. In einer bevorzugten
Ausführungsform umfassen solche erfindungsgemäßen Nukleinsäuren
20 eine Nukleinsäuresequenz, die die in SEQ ID NO. 15 dargestellte
Polypeptidsequenz codiert. Aufgrund der Degeneriertheit des
genetischen Codes ist es für den Fachmann klar, daß dabei die
in SEQ ID NO. 15 angegebene Nukleotidsequenz nur eine einzige
aus der Gruppe der das Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 15
25 codierenden Nukleotidsequenzen darstellt.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ihre Umgebung kann dabei
dergestalt sein, daß die Biosynthese des Polypeptids im Cytosol
erfolgt, wobei der Polypeptidsequenz ggf. ein Start-Methionin
30 vorangestellt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird
dagegen eine N-terminale Signalsequenz verwendet, insbesondere
die OmpA- oder die PhoA-Signalsequenz, um das erfindungsgemäße
Polypeptid in das Periplasma von *E. coli* zu dirigieren, wo die
Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten wird und sich
35 die Polypeptidkette unter oxidativer Ausbildung der
Disulfidbindungen falten kann. Eukaryontische Signalsequenzen
können Verwendung finden, um das erfindungsgemäße Polypeptid in
einem eukaryontischen Wirtsorganismus zu sekretieren.

Grundsätzlich kommen zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure sowohl prokaryontische, bevorzugt *E. coli*, als auch eukaryontische Zellen wie z.B. Hefen in Betracht.

- 5 Unter einem nochmals weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Muteins oder Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird. In der Regel wird dazu zunächst eine geeignete Wirtszelle mit einem Vektor, der eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäure umfaßt, transformiert. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Biosynthese des Polypeptids erfolgt, und das erfindungsgemäße Polypeptid wird gewonnen.
- 10
- 20 Bezüglich des Herstellungsverfahrens ist zu beachten, daß die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins zwei strukturelle Disulfidbindungen aufweisen, und daß in entsprechenden Fusionsproteinen ggf. zusätzliche Disulfidbindungen vorliegen. Die mit der Proteinfaltung einhergehende Ausbildung dieser Disulfidbindungen ist in der Regel gewährleistet, wenn das erfindungsgemäße Polypeptid mit Hilfe einer geeigneten Signalsequenz in ein Zellkompartiment mit oxidierendem Thiol/Disulfid-Redoxmilieu dirigiert wird, beispielsweise das bakterielle Periplasma oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle. Das erfindungsgemäße Polypeptid läßt sich dabei durch Zellfraktionierung freisetzen oder aus dem Kulturüberstand gewinnen. Ggf. läßt sich die Faltungseffizienz durch Überproduktion von Protein-Disulfidisomerasen, wie z.B. dem DsbC-Protein von *E. coli*, oder von Faltungs-Hilfsproteinen steigern.
- 30
- 35

Andererseits ist es möglich, ein erfindungsgemäßes Polypeptid

im Cytosol einer Wirtszelle, bevorzugt *E. coli*, zu produzieren. Es kann dann z.B. in Form von Einschußkörpern gewonnen und anschließend *in vitro* renaturiert werden. Je nach

Verwendungszweck kann das Protein mittels verschiedener dem Fachmann bekannter Methoden gereinigt werden. Zur Reinigung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins eignet sich z.B. die Affinitätschromatographie mit einem Säulenmaterial, welches Digoxigeningruppen trägt. Zur Reinigung von Fusionsproteinen der Muteine des Bilin-Bindungsproteins

können die aus dem Stand der Technik bekannten Affinitätseigenschaften des Fusionsproteins ausgenutzt werden, z.B. die des Strep-Tags oder des Strep-Tags II (Schmidt und Skerra, J. Chromatogr. A 676 (1994), 337-345; Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), die der Albumin-Bindungsdomäne (Nygren et al., J. Mol. Recogn. 1 (1988), 69-74) oder die der Alkalischen Phosphatase (McCafferty et al., Protein Eng. 4 (1991) 955-961). Bei den Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Tatsache, daß die Muteine des Bilin-Bindungsproteins nur aus einer einzelnen Polypeptidkette bestehen, von Vorteil, da weder dafür zu sorgen ist, daß mehrere verschiedene Polypeptidketten gleichzeitig innerhalb einer Zelle synthetisiert werden müssen, noch, daß unterschiedliche Polypeptidketten in funktioneller Weise miteinander assoziieren.

Die praktischen Anwendungsmöglichkeiten für die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins entsprechen im wesentlichen denjenigen herkömmlicher Antikörper oder Antikörperfragmente mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin. Demnach betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins in einem Verfahren zum Nachweis, zur Bestimmung, zur Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins oder ihrer Fusionsproteine in Nachweisverfahren kann im wesentlichen analog zu den entsprechenden Nachweisverfahren erfolgen, die für Antikörper gegen Digoxigenin, sowie deren Fragmente und/oder Konjugate, bekannt sind. Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung deshalb ein Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

Zu diesem Zweck kann das Mutein direkt, z.B. durch kovalente Kopplung, markiert sein. Aber auch indirekte Markierungen, z.B. mittels markierter Antikörper gegen das Bilin-Bindungsprotein oder dessen Muteine oder gegen Domänen von Fusionsproteinen dieser Muteine, können eingesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung erfindungsgemäßer Fusionsproteine mit einem Enzym, z.B. der Alkalischen Phosphatase, anstelle eines markierten Muteins des Bilin-Bindungsproteins. In diesem Fall läßt sich das Bestimmungsverfahren mit einer besonders geringen Zahl von Verfahrensschritten gestalten, wobei z.B. die Fähigkeit zur Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder lumineszenten Nachweisreaktion durch das Enzym als Bestandteil des Fusionsproteins unmittelbar ausgenutzt werden kann. Die leichte Verfügbarkeit solcher Fusionsproteine stellt hierbei einen besonderen Vorteil im Vergleich zu entsprechenden Fusionsproteinen herkömmlicher Antikörper dar. Die Ausnutzung des oben beschriebenen Aviditätseffekts im Fall eines oligomeren Fusionsproteins stellt einen weiteren Vorteil bei einem solchen Verfahren dar.

Ein Bestimmungsverfahren für die Digoxigeningruppe kann z.B. qualitativ zum Nachweis von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Nukleinsäuren in Southern- bzw. Northern-Blots

- oder von mit der Digoxigenin-Gruppe konjugierten Proteinen in Western-Blots durchgeführt werden. Ein Bestimmungsverfahren kann auch quantitativ zum Nachweis von mit der Digoxigenin-Gruppe konjugierten Proteinen im ELISA durchgeführt werden. Zudem eignet sich ein erfindungsgemäßes Bestimmungsverfahren zum indirekten Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Proteinen oder anderen Molekülen unter Verwendung eines gegen das Protein oder Molekül gerichteten Bindungsproteins, z.B. eines Antikörpers bzw. seines Fragments, welches mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert ist. Auch der indirekte Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Nukleinsäuren unter Verwendung einer mit dieser Nukleinsäure hybridisierenden Sonde, welche mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert ist, ist möglich. Eine Anwendung in der medizinischen Diagnostik oder Therapie ergibt sich zudem bei der Bestimmung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin, ohne daß diese Liganden mit einem anderen Molekül konjugiert sein müssen.
- Die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine können auch zur Immobilisierung eines mit der Digoxigenin-Gruppe konjugierten Moleküls verwendet werden. Diese Immobilisierung erfolgt vorzugsweise an mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen beschichteten Festphasen, wie etwa Mikrotiterplatten, Immunosticks, Mikrobeads aus organischen, anorganischen oder paramagnetischen Materialien oder Sensoroberflächen.
- Dementsprechend können die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine ebenfalls zur Abtrennung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin oder eines mit einer dieser Verbindungen konjugierten Moleküls verwendet werden. In diesem Fall kommen neben den genannten Festphasen auch Säulenmaterialien zur Beschichtung mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen in Betracht. Vorzugsweise kann diese Beschichtung durch Kopplung mittels chemisch reaktiver Gruppen auf geeigneten Säulenmaterialien erfolgen. Derartig beschichtete Säulenmaterialien können zur Abtrennung von mit

Digoxigeningruppen konjugierten Substanzen sowie ggf. von Komplexen aus solchen Substanzen mit anderen Molekülen aus einer Lösung verwendet werden.

- 5 Beispielsweise können so Antigene aus einer Lösung abgetrennt werden, indem die Lösung mit Antikörpern versetzt wird, welche gegen die Antigene gerichtet und mit der Digoxigeningruppe konjugiert sind, und die erhaltene Lösung mit dem genannten Säulenmaterial unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird,
10 unter denen eine Komplexbildung zwischen den Digoxigeningruppen und einem erfindungsgemäßen Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder seinem Fusionsprotein erfolgt. Ggf. ist im Anschluß an eine solche Abtrennung auch eine Elution der mit Digoxigenin konjugierten Substanz möglich. Diese Elution kann durch
15 Konkurrenz mit Digoxin, Digoxigenin, Digitoxin oder Digitoxigenin erfolgen sowie z.B. durch Absenkung oder Erhöhung des pH-Werts der Lösung. Bei einer kompetitiven Elution kann dabei die höhere Bindungsaffinität der erfindungsgemäßen Muteine zu Digitoxigenin oder Digitoxin im Vergleich zur
20 Digoxigeningruppe in vorteilhafter Weise ausgenutzt werden. Auf diese Weise läßt sich eine mit Digoxigenin konjugierte Substanz isolieren oder reinigen.

Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch die
25 nachstehenden Beispiele und die beigefügten Zeichnungen, in denen:

Figur 1 jeweils eine Fluoreszenztitration des mit dem Strep-tag
30 II fusionierten Muteins DigA16 mit den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain wiedergibt;

Figur 2 die Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B) zur
Herstellung von Fusionsproteinen des Muteins DigA16 mit
der Alkalischen Phosphatase schematisch darstellt;

35 Figur 3 den quantitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase in einem

ELISA demonstriert;

Figur 4 den qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase auf einem Western-Blot zeigt.

Figur 1 zeigt die graphische Darstellung von Ergebnissen aus Beispiel 3, bei der eine 1 μ M Lösung des Muteins DigA16 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Steroide Digoxigenin (Quadrate), Digitoxigenin (Kreise) und Ouabain (Rauten) versetzt wurde. Die jeweiligen Proteinfluoreszenzintensitäten wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm gemessen und gegen die aktuelle Gesamtkonzentration des Steroids im jeweiligen Ansatz aufgetragen. Die Datenpunkte wurden schließlich mittels nicht linearer Regression durch eine Ausgleichskurve angepaßt.

Figur 2 zeigt eine Zeichnung der Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B). pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit ihrer eigenen Signalsequenz, einem Peptid-Linker mit der Sequenz Pro-Pro-Ser-Ala, dem Mutein DigA16 sowie dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel. Das entsprechende Strukturgen wird von dem *dsbC*-Strukturgen (einschließlich dessen ribosomaler Bindungsstelle) aus *E. coli* (Zapun et al., Biochemistry 34 (1995), 5075-5089) als zweitem Cistron gefolgt. Das dadurch gebildete künstliche Operon steht unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{P/O}$) und endet am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}). Weitere Elemente des Vektors sind der Replikationsursprung (*ori*), die intergenische Region des filamentösen Bakteriophagen f1 (*f1-IG*), das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und das Tetracyclin-Repressorgen (*tetR*). pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, dem Mutein DigA16, dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel, einem Peptid-Verbindungsstück bestehend aus fünf Glycinresten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase ohne ihre N-terminale

Aminosäure Arginin. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereiches sind mit dem Vektor pBBP27 identisch.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 4, in dem der quantitative Nachweis von Digoxigeningruppen mit Hilfe der Fusionsproteine des Muteins DigA16 als Genprodukt der Vektoren pBBP27 (geschlossene Symbole) und pBBP29 (offene Symbole) geführt wurde. Hierbei waren die Digoxigeningruppen einerseits an Rinder-Serumalbumin (BSA, Quadrate) oder andererseits an Albumin aus Hühner-Ei (Ovalbumin, Dreiecke) gekoppelt. Als Kontrolle sind die Daten dargestellt, die bei der Verwendung von underivatisiertem Rinder-Serumalbumin sowie dem Fusionsprotein kodiert von pBBP27 erhalten wurden (offene Kreise). Die dem jeweiligen gebundenen Fusionsprotein entsprechende enzymatische Aktivität wurde anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nicht lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) mittels der Gleichung

$$[P \cdot L] = [L]_t [P]_t / (K_d + [P]_t).$$

Hierbei entspricht $[P]_t$ der eingesetzten Gesamtkonzentration des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \cdot L]$ wird anhand der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die innerhalb einer Konzentrationsreihe konstante Gesamtkonzentration der Digoxigeningruppen $[L]_t$ je Vertiefung sowie die Dissoziationskonstante K_d wurden durch nicht lineare Regression als Parameter angepaßt.

Figur 4 zeigt das Ergebnis eines Western Blot-Experiments aus Beispiel 4 zum qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen mittels der von pBBP27 (Spuren 1 und 2) sowie von pBBP29 (Spuren 3 und 4) kodierten Fusionsproteine des Muteins DigA16. Zum Vergleich ist ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel der

Biomoleküle ebenfalls dargestellt (Spuren 5 und 6). Hierbei wurde in den Spuren 1, 3 und 5 jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg underivatisiertem BSA, underivatisiertem Ovalbumin und underivatisierter RNaseA aufgetrennt. In den Spuren 2, 4 und 6 wurde jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg mit Digoxigeningruppen gekoppeltem BSA, mit Digoxigeningruppen gekoppeltem Ovalbumin und mit Digoxigeningruppen gekoppelter RNaseA aufgetrennt.

Beispiele

Sofern nicht anders angegeben, wurden die dem Fachmann geläufigen gentechnischen Methoden, wie sie z.B. in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) beschrieben sind, verwendet.

Beispiel 1: Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins, Phagemidpräsentation und Selektion eines Muteins mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin

Zur Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurden dessen Aminosäure-Sequenzpositionen 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer konzertierten Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in mehreren Schritten unterworfen. Die PCR-Reaktionen wurden zunächst in zwei getrennten Amplifizierungsschritten in einem Volumen von je 50 µl durchgeführt, wobei 10 ng pBBP20-Phasmid-DNA (SEQ ID NO:1) als Matrize sowie jeweils 25 pmol zweier Primer (SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 in einem Ansatz und SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 in einem zweiten Ansatz), welche nach der allgemein bekannten Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, eingesetzt wurden.

Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10xTaq-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % v/v Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂ und 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren

Thermostatisierblock für 2 min auf 94°C erhitzt. Anschließend wurden 2,5 u Taq DNA-Polymerase (5 u/µl, Promega) zugegeben und 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 60°C, 1,5 min bei 72°C, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei 60°C, durchgeführt. Die gewünschten Amplifizierungsprodukte wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung des Jetsorb DNA Extraction Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers aus Low Melting Point Agarose (Gibco BRL) isoliert.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP20 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit einer Hexanukleotidsequenz, die durch Ligierung eines XbaI-Überhangs mit einem dazu komplementären SpeI-Überhang erhalten wurde, und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

Der darauffolgende Amplifizierungsschritt wurde in einem 100 µl-Ansatz durchgeführt, wobei jeweils ca. 6 ng der beiden isolierten Fragmente als Matrize, je 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 sowie 1 pmol des Oligodesoxynukleotids SEQ ID NO:8 eingesetzt wurden. Die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden wie in den vorangegangenen Amplifizierungsschritten mit der doppelten Menge zugesetzt. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1,5 min bei 72°C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 60°C. Das erhaltene Fragment wurde erneut durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Zur Klonierung dieses Fragments, welches die Bibliothek der Muteine in Form einer Mischung von Nukleinsäuren repräsentierte, wurde es zunächst mit dem Restriktionsenzym BstXI (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des erhaltenen Nukleinsäurefragments

(335 Basenpaare, bp) erfolgte wiederum mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese. Analog wurde die DNA des Vektors pBBP20 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3971 bp) isoliert.

5

Zur Ligierung wurden 0,93 µg (4,2 pmol) des PCR-Fragments und 11 µg (4,2 pmol) des Vektorfragments in Gegenwart von 102 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 500 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für zwei Tage bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20°C für drei Tage wurde zentrifugiert (25 min, 16000 g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 200 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 43,6 µl TE/10 (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden im Vergleich mit einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Präparation elektrokompetenter Zellen des *E. coli* K12-Stamms XL1-Blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-379) erfolgte gemäß den von Tung und Chow (Trends Genet. 11 (1995), 128-129) und von Hengen (Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 75-76) beschriebenen Methoden. 1 l LB-Medium wurde durch Zugabe einer stationären XL1-Blue Übernachtskultur auf eine optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,08 eingestellt und bei 200 Upm und 26°C in einem 3 l-Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils 500 ml eiskaltem 10 % w/v Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem GYT-Medium (10 % w/v Glycerin, 0,125 % w/v Hefeextrakt, 0,25 % w/v Trypton) resuspendiert.

Zur Elektroporation wurde das Easyjec T Basic System (EquiBio) mit den dazugehörigen Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Jeweils 5 bis 6 µl der oben beschriebenen DNA-Lösung (245 ng/µl) wurde mit 40 µl der Zellsuspension gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Küvette überführt. Nach der Elektroporation wurde die Suspension sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium (2 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend jeweils für 2 min bei 3600 g sedimentiert, in 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB/Amp) resuspendiert und zu je 200 µl auf Agar-Platten (140 mm Durchmesser) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Unter Einsatz von insgesamt 10,7 µg der ligierten DNA wurden auf diese Weise mit acht Elektroporationsansätzen $3,73 \cdot 10^8$ Transformanten erhalten, die auf 40 Agar-Platten verteilt waren.

Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die so erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm geschüttelt. 50 ml auf 37°C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium wurden mit 2,88 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 1,0 lag. Diese Kultur wurde für 6 h bei 37°C, 160 Upm bis zu einer stationären Zelldichte inkubiert und die Phasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde schließlich in 100 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von rekombinanten Phagemiden (Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press), welche die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusion mit dem verkürzten Hüllprotein pIII tragen, wurde die so gewonnene Phasmid-DNA zur Transformation elektrokompenter Zellen von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Elektroporation wurde wie oben beschrieben mit

Hilfe des Easyjec T Basic Systems durchgeführt. In insgesamt 13 Ansätzen wurden je 40 μ l der Zellsuspension elektrokompeter Zellen mit jeweils 2 μ g der DNA in einem Volumen von 5 μ l transformiert. Nach der Elektroporation wurde die erhaltene
5 Zellsuspension aus jedem Ansatz sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt.

Diese Ansätze wurden vereinigt (Volumen = 26 ml), mit 74 ml
10 2xYT-Medium und mit 100 μ l Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l) versetzt. Durch Ausplattieren von 100 μ l einer 1:10⁵-Verdünnung der erhaltenen Suspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanten zu $1,1 \cdot 10^{10}$ abgeschätzt. Nach
15 Inkubation für 60 min bei 37°C und 160 Upm wurde die Kultur mit 500 μ l VCS-M13 Helferphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 60 min bei 37°C, 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 200 μ l Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur
20 auf 26°C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der Genexpression Anhydrotetracyclin (50 μ l einer 50 μ g/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 μ g/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26°C, 160 Upm inkubiert.

25

Zwecks Abtrennung der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (15 min, 12000 g, 4°C). Der Überstand, der die Phagemidpartikel enthielt, wurde sterilfiltriert (0,45 μ m), mit 1/4 Volumen (25
30 ml) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18000 g, 4°C) wurden die präzipitierten Phagemidpartikel in insgesamt 4 ml kaltem PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4) gelöst. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und zu gleichen Volumina auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt.
35 Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile (5 min, 18500 g, 4°C) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur erneuten Fällung der Phagemidpartikel wurde mit 1/4 Volumen (jeweils 0,25 ml pro Reaktionsgefäß) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18500 g, 4°C) wurde der Überstand entfernt, und die präzipitierten Phagemidpartikel wurden in jeweils 0,5 ml PBS gelöst. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Lösung zur Klärung noch einmal zentrifugiert (5 min, 18500 g, 4°C). Der Überstand mit den Phagemidpartikeln (zwischen $1 \cdot 10^{12}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) wurde anschließend für die Affinitätsanreicherung eingesetzt.

Zur Affinitätsanreicherung der die Muteine des Bilin-Bindungsproteins präsentierenden rekombinanten Phagemide wurden Immuno-Sticks (NUNC) verwendet. Diese wurden über Nacht mit 800 µl eines Konjugats (100 µg/ml) aus Ribonuclease A (RNaseA) und Digoxigenin in PBS beschichtet.

Zur Herstellung des Konjugats wurden 1,46 µmol (0,96 mg) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS, Boehringer Mannheim) in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 0,73 µmol (10 mg) RNaseA (Fluka) in 1 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz von dem RNaseA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBST (PBS mit 0,1 % v/v Tween 20) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBST wurde der Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 µl der Phagemidlösung und 500 µl Blockierungspuffer (2 % w/v BSA in PBST) für 1 h bei RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde die Lösung abgezogen und der Immuno-Stick achtmal mit jeweils 950 µl PBST

für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich im Verlauf einer 15minütigen Inkubation des Immuno-Sticks mit 950 μ l einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS (0,742 mg Digoxigenin (Fluka) wurden hierzu in 19,2 μ l DMF gelöst und zu 930,8 μ l PBS gegeben) kompetitiv eluiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurden die 950 μ l Lösung der erhaltenen Elutionsfraktion (je nach Selektionszyklus zwischen 10^6 und 10^8 Colony-forming Units) kurz auf 37°C erwärmt, mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue ($OD_{550} = 0,5$) gemischt und für 30 min bei 37°C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4°C), in 800 μ l frischen 2xYT-Mediums resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37°C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD_{550} bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37°C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ inkubiert, mit 250 μ l VCS-M13 Helferphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert, und es wurde weiter verfahren wie bereits oben beschrieben.

Mit den aus der ersten Affinitätsanreicherung erhaltenen Phagemiden wurden nacheinander acht weitere Anreicherungszyklen mit Immuno-Sticks, welche frisch mit dem Digoxigenin-RNaseA-Konjugat beschichtet waren, durchgeführt. Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Mischung der erhaltenen Kolonien wurde, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert. Mit

dieser Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Plasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

- 5 Um die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusionsprotein mit dem Strep-tag II sowie der Albumin-Bindungsdomäne produzieren zu können, wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor pBBP20 in den Vektor pBBP22 subkloniert. Ein relevanter Ausschnitt aus der
- 10 Nukleinsäuresequenz von pBBP22 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:9 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem
- 15 Vektor pASK75.

- Dazu wurde die aus der Mischung der *E. coli*-Kolonien isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative
- 20 Agarose-Gelelektrophorese wie oben beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

- 25 Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Mit 5 μ l dieses Ligierungsansatzes wurden 200 μ l kompetente Zellen des
- 30 Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert (Sambrook et al., supra), wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.

- Die Transformanten wurden anschließend mittels eines Colony
- 35 Screening Assays auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigeningruppe durchgemustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-

Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 μm) aufgelegt.
Auf dieser Membran wurden 150 μl der Zellsuspension aus dem
Transformationsansatz gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500
Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 7,5 h bei 37°C
5 im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser
von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurecht-
geschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P,
10 Porengröße 0,45 μm) nach den Angaben des Herstellers mit PBS
angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in einer
Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA, Sigma) in PBS
geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden
durch Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für
15 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils
10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml
LB/Amp-Medium, dem 200 $\mu\text{g/l}$ Anhydrotetracyclin zugesetzt worden
war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle
markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der
20 zusätzlich 200 $\mu\text{g/l}$ Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile
Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran
aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die
25 Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22°C für 15 h
inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Muteine
als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels
Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA
auf der unteren Membran immobilisiert.

30 Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine
frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4°C aufbewahrt.
Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10
min mit 20 ml PBST gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml
35 einer Lösung von 10 $\mu\text{g/ml}$ eines Konjugates von BSA mit
Digoxigenin in PBST inkubiert.

Zur Herstellung des Konjugates von BSA (Sigma) und Digoxigenin

wurde eine Lösung von 3,0 μmol (1,98 mg) DIG-NHS in 25 μl DMSO μl -weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA (Sigma) in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert
5 und überschüssiges Reagenz von dem BSA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Um gebundenes Digoxigenin-BSA-Konjugat nachzuweisen, wurde die
10 Membran nach zweimaligem Waschen in 20 ml PBST für 1 h mit 10 ml Anti-Digoxigenin Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim, 1:1000 verdünnt in PBST) inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml PBST und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und für 10 min in AP-
15 Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl_2) geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, Roth, 50 $\mu\text{g/ml}$ in Dimethylformamid) und 5 μl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, 75 $\mu\text{g/ml}$ in 70 % v/v
20 Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Muteine des Bilin-Bindungsproteins, in Form der Fusionsproteine mit dem Strep-tag
25 und der ABD, für Digoxigenin nachgewiesen.

Vier der Kolonien von der oberen Membran, welche zu einem aufgeprägten Farbsignal Anlaß gaben, wurden zur Herstellung von Kulturen in LB/Amp-Medium mit einem Volumen von 4 ml verwendet.
30 Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert, und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des T7 Sequencing Kits (Pharmacia) nach Herstellerangaben
35 unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11. Dabei wurde gefunden, daß alle vier untersuchten Plasmide die gleiche Nukleotidsequenz trugen. Das entsprechende Genprodukt wurde als DigA bezeichnet (SEQ ID NO:12). Die

Nukleotidsequenz von DigA wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt und ist im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

5 Beispiel 2: Partielle Zufallsmutagenese des Muteins DigA und Selektion von Muteinen mit verbesserter Bindungsaffinität zu Digoxigenin

10 Zur Verbesserung der Affinität zwischen dem Mutein DigA und Digoxigenin, welche gemäß Beispiel 3 zu 295 ± 36 nM bestimmt wurde, wurden die 6 Aminosäurepositionen 28, 31 und 34-37 in DigA für eine weitergehende partielle Zufallsmutagenese ausgewählt.

15 Zur Mutagenese dieser Positionen wurde die PCR mit einem degenerierten Oligodesoxynukleotid-Primer durchgeführt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μ l, wobei 2 ng der für DigA (SEQ ID NO:12) kodierenden Plasmid-DNA des Vektors pBBP22 als Matrize eingesetzt wurden. Der
20 Reaktionsansatz enthielt 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:13 und SEQ ID NO:7 sowie die restlichen Komponenten gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 65°C, 1,5 min bei 72°C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für
25 5 min bei 60°C. Das erhaltene DNA-Fragment wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anschließend mit *Bst*XI nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des resultierenden DNA-Fragmentes von 335 bp Länge erfolgte wiederum durch präparative Agarose-Gelelektrophorese.

30

Entsprechend wurde die DNA des Vektors pBBP24 mit *Bst*XI geschnitten und das erhaltene Fragment von 4028 bp isoliert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP24 ist mit der kodierte Aminosäuresequenz im
35 Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:14 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75. pBBP24 ist weitestgehend

identisch mit pBBP20 wobei das BBP-Gen mittels entsprechend eingeführter Stopp-Kodons inaktiviert ist.

Zur Ligierung wurden 1,3 μg des geschnittenen DNA-Fragmentes aus der PCR und 16,0 μg des Fragmentes von pBBP24 in Gegenwart von 120 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 600 μl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA) für 18 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 μl des Ligierungsansatzes mit 10 μg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 μl 5 M Ammoniumacetat und 100 μl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20°C für zwei Wochen wurde zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4°C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 150 μl Ethanol (70 % v/v, -20°C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 80 μl TE/10 aufgenommen.

Die Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit der ligierten DNA durch Elektroporation wurde gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, wobei in 16 Ansätzen jeweils 40 μl Zellsuspension elektrokompeter Zellen mit 5 μl der DNA-Lösung gemischt wurden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt.

Die vereinigten Suspensionen wurden mit 168 ml 2xYT-Medium und mit 200 μl Ampicillin versetzt (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l). Durch Ausplattieren von 100 μl einer 1:10⁴-Verdünnung der erhaltenen Zellsuspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanten zu $1,48 \cdot 10^9$ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37°C und 160 Upm wurden die Transformanten mit 4 ml VCS-M13 Helferphage ($6,3 \cdot 10^{11}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 30 min bei 37°C und 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 400 μl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur auf 26°C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der

Genexpression Anhydrotetracyclin (100 μ l einer 50 μ g/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 μ g/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26°C und 160 Upm inkubiert. Die
5 Abtrennung der Zellen und die Reinigung der Phagemide durch Fällung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Zur Affinitätsanreicherung aus der Bibliothek der Phagemide, welche das partiell mutierte Mutein DigA präsentierten, wurden
10 mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) zusammen mit einem Doppelkonjugat von BSA mit Digoxigenin und Biotin eingesetzt.

Zur Herstellung eines Doppelkonjugates von BSA mit Digoxigenin
15 und Biotin wurden 1,5 μ mol (0,99 mg) DIG-NHS in 12,5 μ l DMSO und 1,5 μ mol (0,68 mg) D-Biotinoyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester (Boehringer Mannheim) in 12,5 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der
20 Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrations-säule nach den Angaben des Herstellers von dem Doppelkonjugat abgetrennt.

25 Zur Anreicherung Digoxigenin bindender Phagemide wurden 40 μ l einer 0,5 μ M Lösung des Doppelkonjugats (33,5 μ g/ml) in PBS mit 260 μ l einer Lösung der frisch präparierten Phagemide (zwischen $5 \cdot 10^{11}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, so daß Komplexbildung zwischen der Digoxigeningruppe und den
30 von den Phagemiden präsentierten Muteinen eintreten konnte. Anschließend wurde 100 μ l einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben.

Parallel wurden 100 μ l der kommerziell erhältlichen Suspension
35 der paramagnetischen Partikel dreimal mit jeweils 100 μ l PBS gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml Eppendorfgefäßes für 1 min in Suspension gehalten, anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des

Eppendorfgefäßes gesammelt und der Überstand abgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 μ l 2 % w/v BSA in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die paramagnetischen Partikel mit der Mischung aus dem Doppelkonjugat und den Phagemiden versetzt, resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins wurde die Mischung schließlich mit 10 μ l einer Lösung von 4 μ M D-Desthiobiotin (Sigma) in PBS versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurde auch verhindert, dass das Strep-tag II als Teil des Fusionsproteins aus den Muteinen und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit dem Streptavidin einen Komplex bilden konnte.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml frischem PBST unter Zusatz von 1 mM D-Desthiobiotin gewaschen, die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten gesammelt und der Überstand wurde abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch 15minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 μ l 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde im Anschluß daran sofort durch Zugabe von 140 μ l 0,5 M Tris neutralisiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurde die erhaltene Elutionsfraktion entsprechend der Vorgehensweise in Beispiel 1 mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue ($OD_{550} = 0,5$) gemischt und für 30 min bei 37°C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4°C), in 800 μ l frischem 2xYT-Medium resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32°C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37°C, 200 Upm

geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37°C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert und mit 300 µl VCS-M13 Helferphage (6,3•10¹¹ pfu/ml, Stratagene) infiziert. Anschließend erfolgte eine erneute Affinitätsselektion mit den paramagnetischen Partikeln und dem Digoxigenin/Biotin-Doppelkonjugat unter den oben angegebenen Bedingungen. Auf diese Weise wurden insgesamt 4 Selektionszyklen durchgeführt.

Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Mit der Mischung der erhaltenen Kolonien, die, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert worden waren, wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

Anschließend wurde die Genkassette zwischen den beiden BstXI-Schnittstellen wie in Beispiel 1 aus dem Vektor pBBP24 in den Vektor pBBP22 subkloniert und kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert. Die Transformanten wurden schließlich wiederum gemäß Beispiel 1 auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigenin-Gruppe mittels des Colony Screening Assays durchgemustert.

Sieben der Kolonien, die im Colony Screening Assay eine starke Signalintensität aufwiesen, wurden kultiviert. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde wie in Beispiel 1 einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde gefunden, daß alle

35

untersuchten Plasmide unterschiedliche Sequenzen besaßen. Nach Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wiesen sechs der sieben untersuchten Varianten ein Amber Stopp-Kodon an der Aminosäureposition 28 auf. Dieses Stopp-Kodon wurde allerdings bei der Wahl geeigneter Amber-Suppressor-stämme, wie zum Beispiel *E. coli* XL1-Blue oder TG1-F⁻, zumindest teilweise supprimiert und statt dessen als Glutamin translatiert. Somit wurde sowohl im Verlauf der Affinitätsanreicherung als auch beim Colony Screening Assay funktionelles Protein in voller Länge produziert.

Als einziges unter den gefundenen Muteinen wies das Mutein mit der SEQ ID NO:15 kein Amber-Stoppkodon auf, so daß es sich zur bakteriellen Produktion besonders gut eignete. Dieses Mutein, auch als DigA16 bezeichnet, wurde demzufolge hinsichtlich seiner Bindefähigkeit für die Digoxigenin-Gruppe genauer charakterisiert.

Beispiel 3: Produktion der Muteine DigA und DigA16 und Ermittlung ihrer Affinität für Digoxigenin und dessen Derivate durch Fluoreszenztitration

Zur präparativen Produktion der aus den vorangegangenen Beispielen erhaltenen Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurde der kodierende Genabschnitt zwischen den beiden BstXI-Schnittstellen aus dem Vektor des Typs pBBP22 in das Expressionsplasmid pBBP21 subkloniert. Das dabei erhaltene Plasmid kodierte für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, gefolgt von dem Mutein und dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP21 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:16 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit einem Hexanukleotid, das durch Ligierung eines stumpfen Strangendes mit einem aufgefüllten HindIII-Strangende erhalten wurde, wobei

die ursprüngliche *Hind*III-Schnittstelle verloren ging. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.

- 5 Zur Subklonierung wurde die für das jeweilige Mutein kodierende Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP21
10 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (4132 bp) isoliert.

- Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM
15 $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und für 16 h bei 16°C inkubiert. Mit 5 μ l des Ligierungsansatzes wurde dann *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119) nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert, wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten
20 wurden. Von dieser Suspension wurden 100 μ l auf einer Agar-Platte mit LB/Amp-Medium ausplattiert und für 14 h bei 37°C inkubiert.

- Zur Proteinproduktion wurde eine der erhaltenen Einzelkolonien
25 ausgewählt, eine 50 ml-Vorkultur (LB/Amp-Medium) damit angeimpft und bei 30°C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 40 ml der Vorkultur wurden auf 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft, woraufhin die Kultur bei 22°C und 200 Upm inkubiert wurde. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$
30 wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 μ g/l Anhydrotetracyclin (200 μ l einer 2 mg/ml-StammLösung in DMF) induziert und für weitere 3 h bei 22°C, 200 Upm geschüttelt.

- Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 4420 g, 4°C) und
35 nach Entfernung des Überstands unter Kühlung auf Eis in 20 ml Periplasma-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinander-

folgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (15 min, 4420 g, 4°C und 15 min, 30000 g, 4°C). Der so gewonnene periplasmatische Proteinextrakt wurde gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert, sterilfiltriert und zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

Die Reinigung erfolgte mittels des an den C-Terminus der Muteine fusionierten Strep-tag II-Affinitätsanhängsels (Schmidt und Skerra, Protein Eng. 6 (1993), 109-122). Im vorliegenden Fall wurde das Streptavidinmutein "1" eingesetzt (Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), welches (mit 5 mg/ml immobilisiertem Streptavidin, bezogen auf das Bettvolumen der Matrix) an eine aktivierte Sepharose gekoppelt war.

Eine mit 2 ml dieses Materials befüllte Chromatographiesäule wurde bei 4°C und einer Flußrate von 20 ml/h mit 10 ml SA-Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm des Eluats in einem Durchfluß-Photometer verfolgt. Nach dem Auftragen des periplasmatischen Proteinextrakts wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit SA-Puffer gewaschen. Gebundenes Mutein wurde anschließend mit 10 ml einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin (Sigma) in SA-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die das gereinigte Mutein enthielten, wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fling und Gregerson, Anal. Biochem. 155 (1986), 83-88) überprüft und vereinigt. Die Proteinausbeuten lagen zwischen 200 µg und 800 µg je 2 l Kultur.

Die Liganden-Bindungseigenschaften der Muteine DigA, DigA16 sowie des rekombinanten Bilin-Bindungsproteins (SEQ ID NO:16) wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt. Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tyrosin- und/oder Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 345 nm (Spaltbreite 6 nm). Als

Liganden wurden Digoxigenin (Fluka), Digoxin (Fluka), Digitoxigenin (Fluka), Digitoxin (Fluka), Testosteron (Sigma), Ouabain (Fluka) sowie 4-Aminofluorescein (Fluka) eingesetzt. Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine
5 signifikante Eigenfluoreszenz oder Absorption.

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA. Die Lösung des jeweiligen gereinigten Muteins wurde viermal gegen diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen auf eine
10 Konzentration von 1 μM eingestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert (Filtropur S 0,45 μm , Sarstedt). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Absorption bei 280 nm unter Verwendung kalkulatorischer Extinktionskoeffizienten von 53580 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für DigA und DigA16 (Wisconsin
15 Software Package, Genetics Computer Group). Für Bbp wurde der nach Gill und von Hippel (Anal. Biochem. 182 (1989), 319-326) in Gegenwart von Guanidiniumchlorid korrigierte kalkulatorische Extinktionskoeffizient von 54150 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ verwendet.

20 Zur Messung wurden 2 ml der Muteinlösung in einer Quarzküvette, die mit einem Rührfisch ausgestattet war, vorgelegt und im Probenhalter des Photometers auf 25°C temperiert. Anschließend wurden insgesamt 40 μl einer 100 μM bis 500 μM Lösung des Liganden in demselben Puffer in Schritten von 1 μl bis 4 μl
25 zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal als
30 Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % normiert.

Die so erhaltenen Meßwerte einer Titrationsreihe wurden gemäß
35 folgender Formel durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt.

$$F = ([P]_i - [L]_i - K_d) \frac{f_P}{2} + ([P]_i + [L]_i + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_i + [L]_i + K_d)^2}{4} - [P]_i [L]_i}$$

- 5 Dabei bedeuten F die normierte Fluoreszenzintensität und $[L]_i$ die Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationsschritt. $[P]_i$ als die Konzentration des Muteins, f_{PL} als Fluoreszenzkoeffizient des Mutein-Ligandkomplexes und K_d als die thermodynamische Dissoziationskonstante dieses
- 10 Komplexes wurden als freie Parameter an die normierten Daten angepaßt.

Das Ergebnis der Fluoreszenztitrationen des Muteins DigA16 mit den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain ist in

15 Figur 1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß Digitoxigenin noch stärker gebunden wird als Digoxigenin, während für Ouabain keine Bindung beobachtet wird.

Die aus den Fluoreszenztitrationen resultierenden Werte für die

20 Dissoziationskonstanten der Komplexe aus den Muteinen des Bilin-Bindungsproteins und den verschiedenen Liganden sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	<u>Bbp-Variante</u>	<u>Ligand</u>	<u>K_d [nM]</u>
25	Bbp:	Digoxigenin	-*
	DigA:	Digoxigenin	295 ± 37
		Digoxin	200 ± 34
	DigA16:	Digoxigenin	30,2 ± 3,6
		Digoxin	31,1 ± 3,2
30		Digitoxigenin	2,8 ± 2,7
		Digitoxin	2,7 ± 2,0
		Ouabain	-*
		Testosteron	-*
		4-Aminofluorescein	-*

35

*keine nachweisbare Bindungsaktivität

Beispiel 4: Herstellung von Fusionsproteinen aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase und Verwendung zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem ELISA sowie im Western Blot

5

Um zwei verschiedene Fusionsproteine aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) mit unterschiedlicher Anordnung der Partner innerhalb der Polypeptidkette zu produzieren, wurden unter Einsatz der dem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Methoden die beiden Expressionsplasmide pBBP27 und pBBP29 konstruiert.

10

pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus PhoA einschließlich deren Signalsequenz, einem kurzen Peptid-Verbindungsstück mit der Aminosäuresequenz Pro-Pro-Ser-Ala, der dem maturen Mutein DigA16 entsprechenden Sequenz sowie dem Strep-tag II. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP27 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:17 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

15

20

pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus DigA16 mit vorangestellter OmpA-Signalsequenz, gefolgt von der Peptidsequenz für das Strep-tag II, einer Sequenz von 5 Glycinresten und der maturen Sequenz der PhoA ohne die N-terminale Aminosäure Arginin. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP29 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:18 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

30

35

Beide Plasmide kodieren zusätzlich für die bakterielle Protein-Disulfidisomerase DsbC auf einem separaten, in 3'-Richtung gelegenen Cistron. Die Plasmide sind in Figur 2 schematisch

dargestellt.

Die von den Plasmiden pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine wurden analog der in Beispiel 3 beschriebenen Methode zur Herstellung der einfachen Muteine produziert. Um nicht die Metallionen aus dem aktiven Zentrum der PhoA zu komplexieren, wurde der Aufschluß des bakteriellen Periplasmas mit EDTA-freiem Aufschlußpuffer durchgeführt. Als ein die äußere Zellmembran destabilisierendes Agens wurde dem Puffer Polymyxin-B-sulfat (2 mg/ml, Sigma) zugegeben. Alle weiteren zur Reinigung eingesetzten Puffer waren ebenfalls EDTA-frei.

Die mittels des Strep-tag II durch Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteine wurden über Nacht gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Ausbeuten der Fusionsproteine lagen zwischen 100 und 200 µg je 2 l Kulturmedium. Die Reinheit der erhaltenen Fusionsproteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, entsprechend Beispiel 3, überprüft und zu 90-95 % bestimmt. Anschließend wurden die Fusionsproteine zum direkten Nachweis von Konjugaten der Digoxigenin-Gruppe mit verschiedenen Proteinen sowohl in einem Sandwich-ELISA als auch im Western-Blot verwendet.

Während die verwendeten Konjugate von Digoxigenin mit RNaseA und BSA entsprechend Beispiel 1 hergestellt wurden, wurde ein Konjugat von Digoxigenin mit Ovalbumin (Sigma) hergestellt, indem 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (13,5 mg) Ovalbumin in 1,9 ml 5 % Natriumhydrogencarbonat gegeben wurden. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Ovalbumin-Konjugat abgetrennt.

Zum Nachweis von Digoxigenin-Gruppen in einem Sandwich-ELISA wurden die Vertiefungen von jeweils zwei Spalten einer Mikrotiterplatte (ELISA-Strips, 2x8 Well mit hoher Bindekapazität, F-Form, Greiner) mit je 100 µl einer 100 µg/ml-Lösung des BSA-Digoxigenin-Konjugates bzw. des Ovalbumin-

Digoxigenin-Konjugates in PBS gefüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden die Vertiefungen einer fünften Spalte der Mikrotiterplatte mit 100 μ l einer 100 μ g/ml Lösung von nicht konjugiertem BSA (Sigma) in PBS befüllt und ebenfalls
5 über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden unbelegte Bindungsstellen mit 200 μ l einer Lösung von 2 % w/v BSA in PBST für 2 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 50 μ l einer 1 μ M Lösung des gereinigten Fusionsproteins gefüllt und
10 die Tween-Konzentration durch Zugabe von 1 μ l einer Lösung von 5 % v/v Tween auf 0,1 % v/v eingestellt. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 μ l PBST vorgelegt. Anschließend wurde jeweils in die zweite Vertiefung 50 μ l des gereinigten Fusionsproteins pipettiert, gemischt und davon
15 ausgehend in den weiteren Vertiefungen der Spalte schrittweise 1:2 Verdünnungen zubereitet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der an die Digoxigeningruppen gebundenen Fusionsproteine erfolgte schließlich mittels der
20 durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,8) in die Vertiefungen gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei
25 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) verfolgt.

Das Ergebnis dieser Messung ist in Figur 3 wiedergegeben. Dementsprechend wird die Digoxigeningruppe sowohl als Konjugat
30 mit BSA wie auch als Konjugat mit Ovalbumin erkannt, was darauf schließen läßt, daß die Bindung durch das Mutein DigA16 kontextunabhängig erfolgt. Weiterhin sind beide Fusionsproteine sowohl hinsichtlich der Bindungsfunktion für die Digoxigeningruppe als auch enzymatisch aktiv, und sie geben
35 trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus Anlaß zu nahezu identischen Signalen.

Zur Verwendung der von den Vektoren pBBP27 und pBBP29 kodierten

Fusionsproteine im Western-Blot wurden 5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an Digoxigenin-BSA-Konjugat, Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat und Digoxigenin-RNaseA-Konjugat gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, sowie 5
5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an nicht-derivatisiertem BSA, Ovalbumin und RNaseA ebenfalls gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Proteingemisch durch Elektrottransfer auf Nitrozellulose
10 übertragen (Blake et al., Anal. Biochem. 136 (1984), 175-179). Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min in 10 ml PBST gewaschen und für 1 h mit 10 ml einer 0,5 μ M Lösung jeweils eines der beiden Fusionsproteine inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 5 min in 10 ml PBST und zweimal für 5 min
15 in 10 ml PBS gewaschen und schließlich für 10 min in 10 ml AP-Puffer geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μ l BCIP (50 μ g/ml in Dimethylformamid) und 5 μ l NBT (75 μ g/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert und auf diese
20 Weise gebundenes Fusionsprotein nachgewiesen.

Das Ergebnis dieses Nachweisverfahrens ist in Figur 4 wiedergegeben. Es zeigt sich wiederum, daß die Bindung der Digoxigenin-Gruppe durch beide Fusionsproteine unabhängig vom
25 Trägerprotein ist, und daß mit beiden Fusionsproteinen vergleichbare Signalintensitäten erzielt werden. Dieselben Trägerproteine führen zu keinerlei Signal, wenn sie nicht mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert sind.

Patentansprüche

1. Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, dadurch gekennzeichnet, daß es

5 (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,

(b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und

10 (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationskonstante des Komplexes mit Digoxigenin 15 100 nM oder kleiner ist.

3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine der 20 Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum 25 Bilin-Bindungsprotein trägt.

4. Polypeptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO. 15 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.

30

5. Polypeptid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Markierungsgruppe, ausgewählt aus Enzymmarkierung, radioaktiver Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)- 35 Lumineszenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold, trägt.

6. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder

mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne,
eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den
Aminoterminal des Polypeptids in operabler Weise fusioniert
5 ist.

7. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder
mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein
Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine
10 Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den
Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert
ist.

8. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine
15 für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-
Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7
kodierende Sequenz umfaßt.

9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, dadurch
20 gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO.
15 oder eine andere das Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 15
codierende Nukleotidsequenz umfaßt.

10. Verfahren zur Gewinnung von Digoxigenin bindenden
25 Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, das die Schritte umfaßt:

(a) das Bilin-Bindungsprotein an mindestens einer der
Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90,
95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer Zufallsmutagenese zu
unterwerfen,

30 (b) resultierende Muteine mit Bindungsaffinität zur
Digoxigenin-Gruppe durch Selektion anzureichern und zu
isolieren,

(c) die in Schritt (b) erhaltenen Muteine an mindestens
einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 einer
35 erneuten Zufallsmutagenese zu unterwerfen, und

(d) die resultierenden Muteine wiederum durch Selektion
anzureichern und zu isolieren.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei in Schritt (b) die Selektion durch kompetitive Anreicherung durchgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei freies
5 Digoxigenin oder Digitoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei die Anreicherung in Schritt (d) durch Komplexbildung der
10 Muteine mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des Komplexes durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Dissoziation des Komplexes aus Mutein und Digoxigeningruppe in saurem oder
15 basischem Milieu durchgeführt wird.

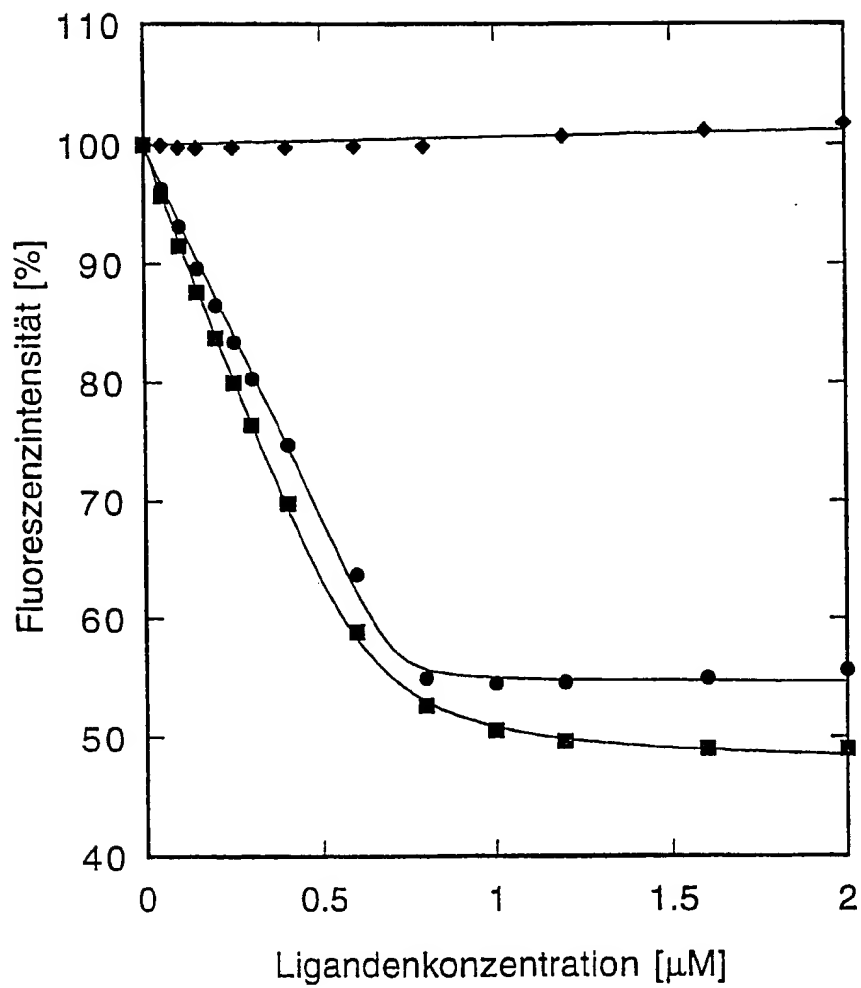
15. Verfahren zur Herstellung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder zur Herstellung
20 eines Muteins, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 erhältlich ist, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende
Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen
25 Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird.

16. Verwendung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder
30 mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Muteins, das nach einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 erhältlich ist, zur Bindung, zum Nachweis, zur Bestimmung, Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von
Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren,
35 Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

17. Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei

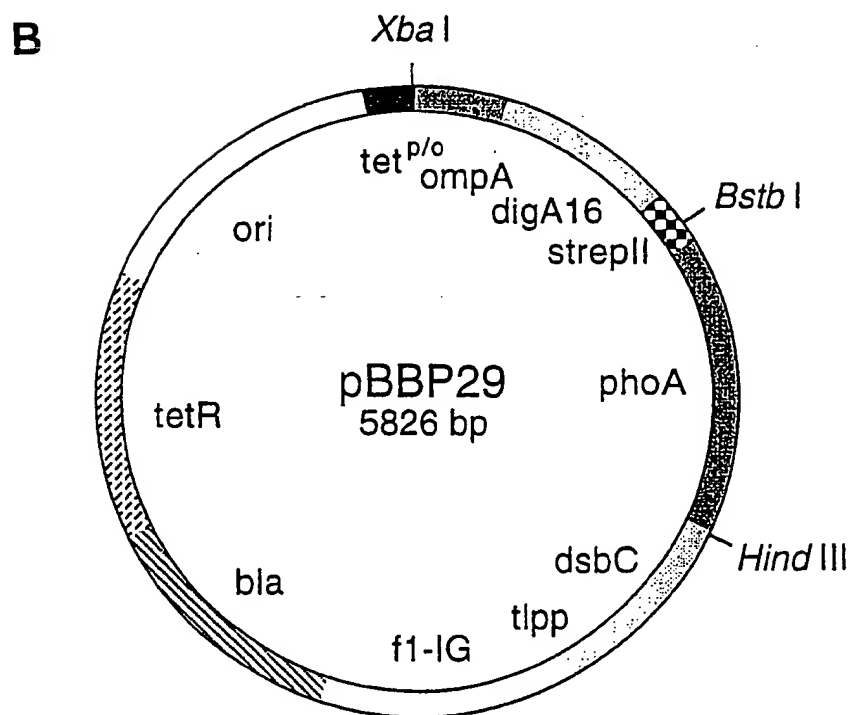
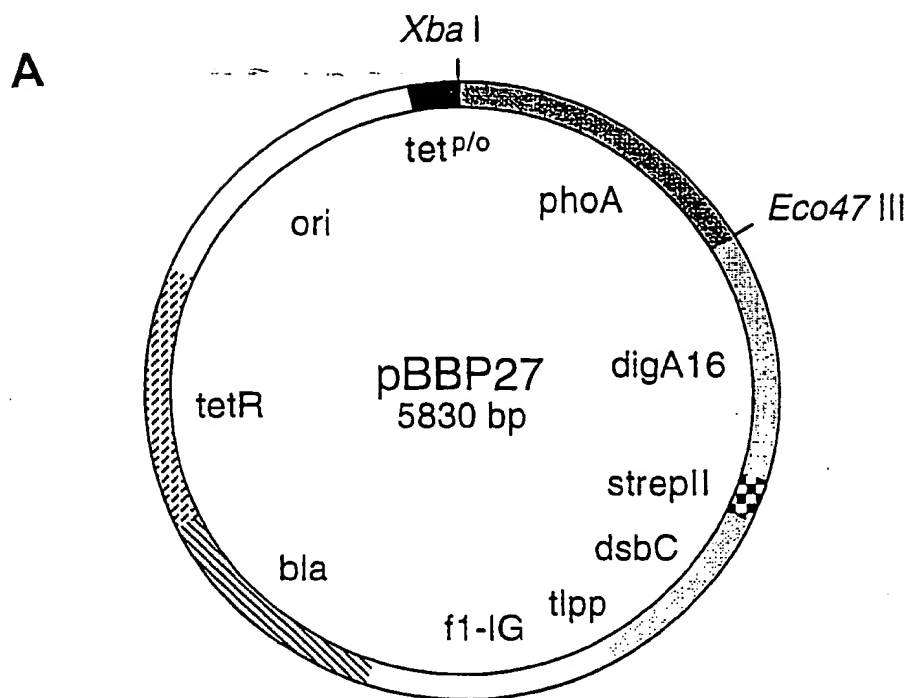
ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein
eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder
mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Mutein, das nach einem
Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14
5 erhältlich ist, mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des
Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des
Muteins an die Digoxigenin-Gruppe zu bewirken, in Kontakt
gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins
bestimmt wird.

1/4

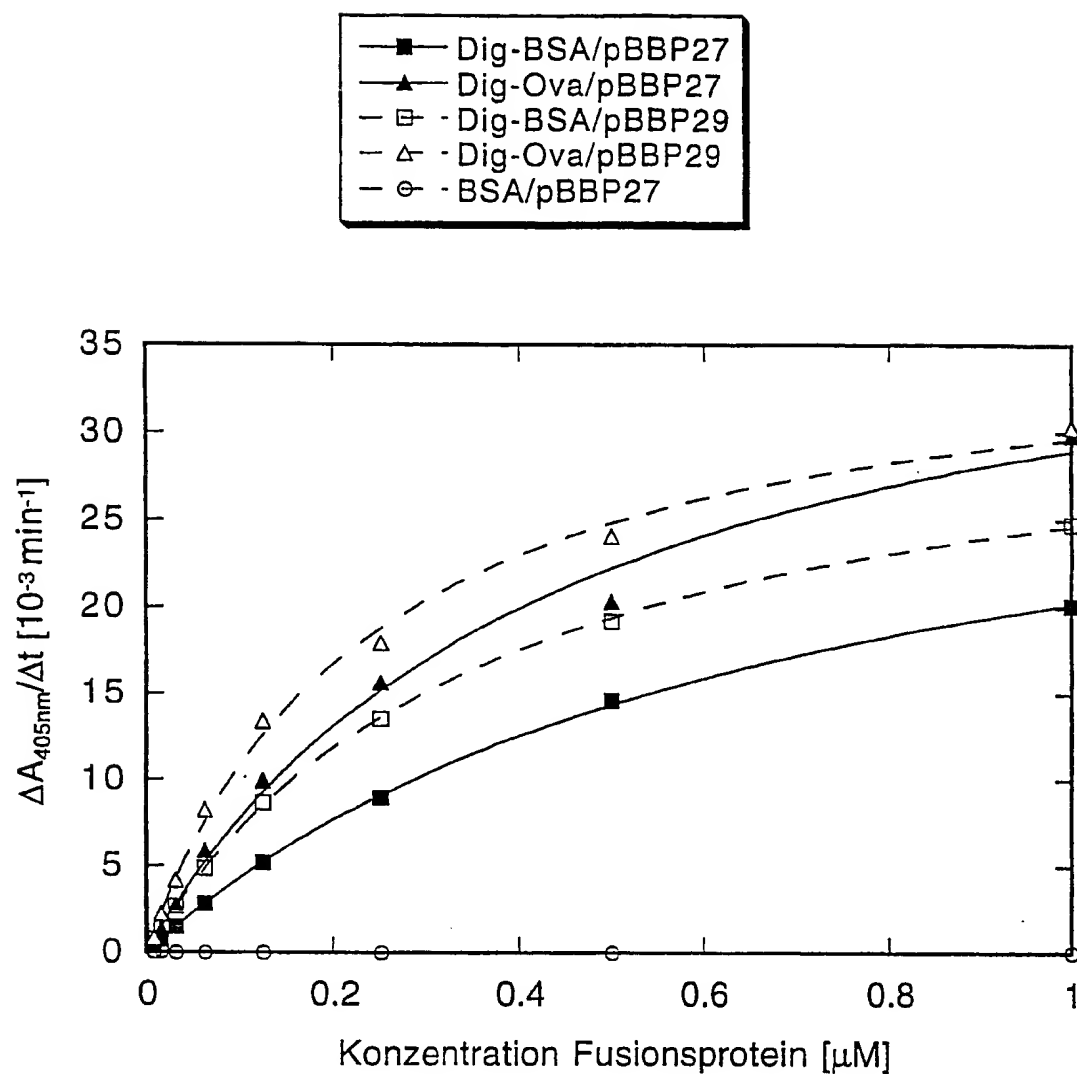


Figur 1

2/4

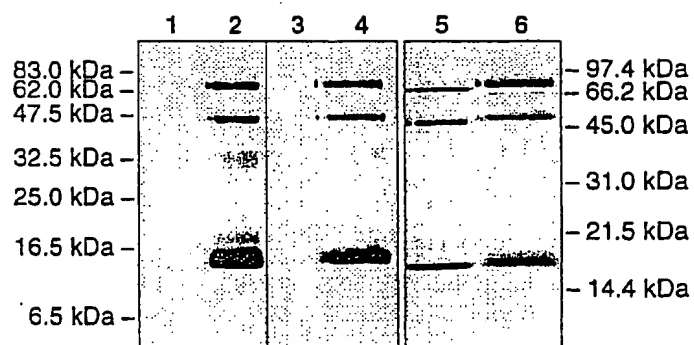
**Figur 2**

3/4



Figur 3

4 / 4



Figur 4

Sequenzprotokoll

<110> Skerra, Arne, Prof. Dr.

5 <120> Muteine des Bilin-Bindungsproteins

<150> DE 199 26 068.0

<151> 1999-06-08

10 <160> 18

<210> 1

<211> 1219 Basenpaare

<212> DNA

15 <213> künstliche Sequenz

<220>

<221> sig_peptide

<222> (22)...(84)

20

<220>

<221> mat_peptide

<222> (85)...(1209)

<223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-tag II und Fragment des

25 Phagen-Hüllproteins pIII

<220>

<221> CDS

<222> (85)...(606)

30 <223> matures Bilin-Bindungsprotein

<220>

<221> CDS

<222> (607)...(636)

35 <223> Strep-tag II-Affinitätsanhängsel

<220>

<221> CDS

<222> (637)...(639)

40 <223> Amber Stop-Codon

<220>

<221> CDS

<222> (640)...(1209)

45 <223> Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII

<400> 1

[illegible]

TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765
 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe
 215 220 225
 5 GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810
 Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu
 230 235 240
 10 AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855
 Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu
 245 250 255
 15 GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900
 Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
 260 265 270
 20 GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945
 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 275 280 285
 TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990
 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp
 290 295 300
 25 AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035
 Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu
 305 310 315
 30 CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080
 Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys
 320 325 330
 35 CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125
 Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg
 335 340 345
 40 GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170
 Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val
 350 355 360
 TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT 1209
 Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 365 370 375
 45 TAATAAGCTT 1219

<210> 2

<211> 64 Basen

50 <212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

55

<400> 2

CCATGGTAAA TGGTGGGAAG TCGCCAAATA CCCCNNKNMS NNSNNKAAGT 50
 ACGGAAAGTG CGGA 64

60

<210> 3

<211> 71 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

5 <220>

<223> Primer

<400> 3

10 GGGTAGGCGG TACCTTCSNN AAAGTATTCC TTGCCGTGGA TTACMNGTA 50
SNNCGAACT TTGACACTCT T 71

<210> 4

15 <211> 74 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

20 <223> Primer

<400> 4

25 CCAAGATTGG AAAGATCTAC CACAGCNSA CTNNKGGAGG TNSACCVVS 50
GAGNNKGTAT TCAACGTACT CTCC 74

<210> 5

<211> 78 Basen

30 <212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

35

<400> 5

TCTGGAGAGC ACCCAGACMN NGTCSNNGTG TCCCTTCTTG TCCTCGTCGT 50
ASNNGCAMN GTATCCGATG ATGTAGTT 78

40

<210> 6

<211> 36 Basen

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

45

<220>

<223> Primer

<400> 6

50

CTTCGACTGG TCCCAGTACC ATGGTAAATG GTGGGA 36

<210> 7
<211> 37 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

5

<220>
<223> Primer
<400> 7

10 CACCAGTAAG GACCATGCTT CTGGAGAGCA CCCAGAC 37

<210> 8
<211> 46 Basen
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

15

<220>
<223> synthetischer Oligodesoxynukleotid

20

<400> 8

AGATCTTTCC AATCTTGGAG TCACCAACTG GGTAGGCGGT ACCTTC 46

25

<210> 9
<211> 793 Basenpaare
<212> DNA
<213> Fragment des Plasmids pBBP22

30

<220>
<221> sig_peptide
<222> (22)...(84)

35

<220>
<221> mat_peptide
<222> (85)...(783)
<223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-Tag II und Albumin-
bindungsdomäne

40

<220>
<221> CDS
<222> (85)...(606)
<223> matures Bilin-Bindungsprotein

45

<220>

<221> CDS

<222> (607)...(636)

<223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

5 <220>

<221> CDS

<222> (637)...(783)

<223> Albumin-Bindungsdomäne aus Protein G

10 <400> 9

```

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT      45
                Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
                -21 -20                -15

15 GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
   Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
               -10                -5                -1 1

20 TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
   Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
               5                10                15

25 GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
   Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
               20                25                30

30 CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
   Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
               35                40                45

35 ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
   Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
               50                55                60

40 CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
   His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
               65                70                75

45 GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
   Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
               80                85                90

50 GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
   Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
               95                100                105

   AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
   Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
               110                115                120

55 GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
   Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
               125                130                135

   ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
   Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
               140                145                150

60 CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
   Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
               155                160                165

```

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180

5 GAA AAA CCA GCT AGC CTG GCT GAA GCT AAA GTT CTG GCT AAC CGT 675
 Glu Lys Pro Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
 185 190 195

10 GAA CTG GAC AAA TAC GGT GTT TCC GAC TAC TAC AAA AAC CTC ATC 720
 Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
 200 205 210

15 AAC AAC GCT AAA ACC GTT GAA GGT GTT AAA GCT CTG ATC GAC GAA 765
 Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu
 215 220 225

ATT CTC GCA GCA CTG CCG TAATAAGCTT 793
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 230

20 <210> 10
 <211> 17 Basen
 <212> DNA

25 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Sequenzierprimer

30 <400> 10
 GACGGTGCCT GTCCCGA 17
 <210> 11

35 <211> 17 Basen
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 40 <223> Sequenzierprimer
 <400> 11
 GACTACTGGG GAGCCGA 17

45 <210> 12
 <211> 522 Basen
 <212> DNA
 <213> codierende Sequenz des Muteins DigA

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(522)
 <223> Mutein DigA ohne Fusionsanteile

55

<400> 12

5 GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC 45
 Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp 15
 1 AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC 90
 Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala 30
 10 AAA TAC CCC CAT CAC GAG CGG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT 135
 Lys Tyr Pro His His Glu Arg Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala 45
 15 GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT 180
 Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser 60
 20 GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA 225
 Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro 75
 25 GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
 Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile 90
 30 GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
 Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp 105
 AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
 Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp 120
 35 AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG 405
 Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met 135
 40 GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC 450
 Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile 150
 45 GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
 Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe 165
 TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT 522
 Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn 170

<210> 13

<211> 76 Basen

<212> DNA

55 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

60 <400> 13

CTGGTCCCAG TACCATGGTA AATGGTGGNN KGTCGCCNNK TACCCCNKN 50
 NKNNKNNKAA GTACGGAAAG TGCGBA 76

<210> 14
 <211> 1219 Basenpaare
 <212> DNA
 <213> Fragment des Phasmids pBBP24

5

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (22)...(84)

10

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (85)...(1209)
 <223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein, Strep-Tag II und Fragment des Phagen-Hüllproteins pIII, mit unterbrochenem Leserahmen

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (85)...(606)
 <223> matures Bilin-Bindungsprotein mit unterbrochenem Leserahmen

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (607)...(636)
 <223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

25

<220>
 <221> CDS
 <222> (637)...(639)
 <223> Amber-Stoppcodon

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (640)...(1209)
 <223> Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII

35

<400> 14

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 -21 -20 -15

40

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
 -10 -5 -1 1

45

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
 Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
 5 10 15

50

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
 Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr

	20	25	30	
5	CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAT TAA TGA TGG GCT GAG TAC 225 Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Asn Trp Ala Glu Tyr	35	40	45
10	ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270 Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile	50	55	60
15	CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly	65	70	75
20	GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly	80	85	90
25	GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405 Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys	95	100	105
30	AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys	110	115	120
35	GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495 Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu	125	130	135
40	ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser	140	145	150
45	CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu	155	160	165
50	GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe	170	175	180
55	GAA AAA TAG GCT GGC GGC GGC TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC 675 Glu Lys Gln Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	185	190	195
60	TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC 720 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly	200	205	210
65	TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe	215	220	225
	GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810 Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu	230	235	240
	AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855 Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu	245	250	255
	GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900 Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile	260	265	270
	GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp			

	275		280		285	
5	TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990					
	Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp					
	290		295		300	
10	AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035					
	Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu					
	305		310		315	
15	CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080					
	Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys					
	320		325		330	
20	CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125					
	Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg					
	335		340		345	
25	GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170					
	Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val					
	350		355		360	
30	TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT 1209					
	Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser					
	365		370		375	
	TAATAAGCTT					1219
35	<210> 15					
	<211> 522 Basenpaare					
	<212> DNA					
	<213> codierende Sequenz des Muteins DigA16					
40	<220>					
	<221> CDS					
	<222> (1)...(522)					
	<223> Mutein DigA16 ohne Fusionsanteile					
45	<400> 15					
50	GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC 45					
	Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp					
	1		5		10	15
55	AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG GTC GCC 90					
	Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln Val Ala					
	20		25		30	
60	GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT 135					
	Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala					
	35		40		45	
65	GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT 180					
	Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser					
	50		55		60	
70	GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA 225					
	Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro					
	65		70		75	

GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
 Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile
 80 85 90

5 GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
 Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp
 95 100 105

10 AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
 Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp
 110 115 120

15 AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG 405
 Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met
 125 130 135

20 GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC 450
 Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile
 140 145 150

GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
 Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe
 155 160 165

25 TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT 522
 Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn
 170

30 <210> 16
 <211> 1380 Basenpaare
 <212> DNA
 <213> Fragment des Plasmids PBBP21

35 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (22)...(84)

40 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (85)...(636)
 <223> Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein und Strep-Tag II

45 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (658)...(717)

50 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (718)...(1365)
 <223> DsbC-Protein

<400> 16

55 TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile

							-21	-20						-15				
5	GCA Ala	GTG Val	GCA Ala	CTG Leu -10	GCT Ala	GGT Gly	TTC Phe	GCT Ala	ACC Thr -5	GTA Val	GCG Ala	CAG Gln	GCC Ala -1	GAC Asp 1	GTG Val	90		
10	TAC Tyr	CAC His	GAC Asp 5	GGT Gly	GCC Ala	TGT Cys	CCC Pro	GAA Glu 10	GTC Val	AAG Lys	CCA Pro	GTC Val	GAC Asp 15	AAC Asn	TTC Phe	135		
15	GAC Asp	TGG Trp	TCC Ser 20	CAG Gln	TAC Tyr	CAT His	GGT Gly	AAA Lys 25	TGG Trp	TGG Trp	GAA Glu	GTC Val	GCC Ala 30	AAA Lys	TAC Tyr	180		
20	CCC Pro	AAC Asn	TCA Ser 35	GTT Val	GAG Glu	AAG Lys	TAC Tyr	GGA Gly 40	AAG Lys	TGC Cys	GGA Gly	TGG Trp	GCT Ala 45	GAG Glu	TAC Tyr	225		
25	ACT Thr	CCT Pro	GAA Glu 50	GGC Gly	AAG Lys	AGT Ser	GTC Val	AAA Lys 55	GTT Val	TCG Ser	AAC Asn	TAC Tyr	CAC His 60	GTA Val	ATC Ile	270		
30	CAC His	GGC Gly	AAG Lys 65	GAA Glu	TAC Tyr	TTT Phe	ATT Ile	GAA Glu 70	GGA Gly	ACT Thr	GCC Ala	TAC Tyr	CCA Pro 75	GTT Val	GGT Gly	315		
35	GAC Asp	TCC Ser	AAG Lys 80	ATT Ile	GGA Gly	AAG Lys	ATC Ile	TAC Tyr 85	CAC His	AGC Ser	CTG Leu	ACT Thr	TAC Tyr 90	GGA Gly	GGT Gly	360		
40	GTC Val	ACC Thr	AAG Lys 95	GAG Glu	AAC Asn	GTA Val	TTC Phe	AAC Asn 100	GTA Val	CTC Leu	TCC Ser	ACT Thr	GAC Asp 105	AAC Asn	AAG Lys	405		
45	AAC Asn	TAC Tyr	ATC Ile 110	ATC Ile	GGA Gly	TAC Tyr	TAC Tyr	TGC Cys 115	AAA Lys	TAC Tyr	GAC Asp	GAG Glu	GAC Asp 120	AAG Lys	AAG Lys	450		
50	GGA Gly	CAC His	CAA Gln 125	GAC Asp	TTC Phe	GTC Val	TGG Trp	GTG Val 130	CTC Leu	TCC Ser	AGA Arg	AGC Ser	ATG Met 135	GTC Val	CTT Leu	495		
55	ACT Thr	GGT Gly	GAA Glu 140	GCC Ala	AAG Lys	ACC Thr	GCT Ala	GTC Val 145	GAG Glu	AAC Asn	TAC Tyr	CTT Leu	ATC Ile 150	GGC Gly	TCC Ser	540		
60	CCA Pro	GTA Val	GTC Val 155	GAC Asp	TCC Ser	CAG Gln	AAA Lys	CTG Leu 160	GTA Val	TAC Tyr	AGT Ser	GAC Asp	TTC Phe 165	TCT Ser	GAA Glu	585		
65	GCC Ala	GCC Ala	TGC Cys 170	AAG Lys	GTC Val	AAC Asn	AAT Asn	AGC Ser 175	AAC Asn	TGG Trp	TCT Ser	CAC His	CCG Pro 180	CAG Gln	TTC Phe	630		
70	GAA Glu	AAA Lys	TAATAAGCTT	CGGGAAGATT	T	ATG Met -20	AAG Lys	AAA Lys	GGT Gly	TTT Phe	ATG Met -15	675						
75	TTG Leu	TTT Phe	ACT Thr	TTG Leu -10	TTA Leu -10	GCG Ala	GCG Ala	TTT Phe	TCA Ser	GGC Gly -5	TTT Phe	GCT Ala	CAG Gln -1	GCT Ala -1	GAT Asp 1	720		
80	GAC Asp	GCG Ala	GCA Ala	ATT Ile 5	CAA Gln	CAA Gln	ACG Thr	TTA Leu 10	GCC Ala 10	AAA Lys	ATG Met	GGC Gly	ATC Ile 15	AAA Lys 15	AGC Ser	765		
85	AGC Ser	GAT Asp	ATT Ile	CAG Gln	CCC Pro	GCG Ala	CCT Pro	GTA Val	GCT Ala	GGC Gly	ATG Met	AAG Lys	ACA Thr	GTT Val	CTG Leu	810		

	20	25	30	
5	ACT AAC AGC GGC GTG TTT TAC ATC ACC GAT GAT GGT AAA CAT ATC 855			
	Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys His Ile			
	35	40	45	
10	ATT CAG GGG CCA ATG TAT GAC GTT AGT GGC ACG GCT CCG GTC AAT 900			
	Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val Asn			
	50	55	60	
15	GTC ACC AAT AAG ATG CTG TTA AAG CAG TTG AAT GCG CTT GAA AAA 945			
	Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys			
	65	70	75	
20	GAG ATG ATC GTT TAT AAA GCG CCG CAG GAA AAA CAC GTC ATC ACC 990			
	Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr			
	80	85	90	
25	GTG TTT ACT GAT ATT ACC TGT GGT TAC TGC CAC AAA CTG CAT GAG 1035			
	Val Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu			
	95	100	105	
30	CAA ATG GCA GAC TAC AAC GCG CTG GGG ATC ACC GTG CGT TAT CTT 1080			
	Gln Met Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu			
	110	115	120	
35	GCT TTC CCG CGC CAG GGG CTG GAC AGC GAT GCA GAG AAA GAA ATG 1125			
	Ala Phe Pro Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met			
	125	130	135	
40	AAA GCT ATC TGG TGT GCG AAA GAT AAA AAC AAA GCG TTT GAT GAT 1170			
	Lys Ala Ile Trp Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp			
	140	145	150	
45	GTG ATG GCA GGT AAA AGC GTC GCA CCA GCC AGT TGC GAC GTG GAT 1215			
	Val Met Ala Gly Lys Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp			
	155	160	165	
50	ATT GCC GAC CAT TAC GCA CTT GGC GTC CAG CTT GGC GTT AGC GGT 1260			
	Ile Ala Asp His Tyr Ala Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly			
	170	175	180	
55	ACT CCG GCA GTT GTG CTG AGC AAT GGC ACA CTT GTT CCG GGT TAC 1305			
	Thr Pro Ala Val Val Leu Ser Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr			
	185	190	195	
60	CAG CCG CCG AAA GAG ATG AAA GAA TTC CTC GAC GAA CAC CAA AAA 1350			
	Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu Phe Leu Asp Glu His Gln Lys			
	200	205	210	
65	ATG ACC AGC GGT AAA TAATTCGCGT AGCTT 1380			
	Met Thr Ser Gly Lys			
	215			

<210> 17

<211> 2009 Basenpaare

<212> DNA

<213> Fragment des Plasmids PBBP27

<220>

<221> sig_peptide

<222> (23)...(85)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (86)...(1999)

5 <223> Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase, Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala, Mutein DigA16 und Strep-Tag II

<220>

<221> CDS

<222> (86)...(1435)

10 <223> maturer Teil der Alkalischen Phosphatase

<220>

<221> CDS

<222> (1436)...(1447)

15 <223> Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala

<220>

<221> CDS

<222> (1448)...(1969)

20 <223> Mutein DigA16

<220>

<221> CDS

<222> (1970)...(1999)

25 <223> Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel

<400> 17

30 TCTAGAACAT GGAGAAAATA AA GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG 46
Val Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu
-21 -20 -15

35 GCA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA 91
Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr
-10 -5 -1 1

40 CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT 136
Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile
5 10 15

45 ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC 181
Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala
20 25 30

50 GCT CTG CGT GAT TCT CTT AGC GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT 226
Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile
35 40 45

55 TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA 271
Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala
50 55 60

CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT 316
Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp
65 70 75

	GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA	361
	Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys	
	80 85 90	
5	AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA	406
	Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala	
	95 100 105	
10	ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC	451
	Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly	
	110 115 120	
15	GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA	496
	Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala	
	125 130 135	
20	AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG	541
	Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu	
	140 145 150	
25	CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC	586
	Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg	
	155 160 165	
30	AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC	631
	Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn	
	170 175 180	
35	GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT	676
	Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu	
	185 190 195	
40	AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT	721
	Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe	
	200 205 210	
45	GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT	766
	Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg	
	215 220 225	
50	GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC	811
	Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala	
	230 235 240	
55	TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT	856
	Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu	
	245 250 255	
60	GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG	901
	Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro	
	260 265 270	
65	AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT	946
	Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys	
	275 280 285	
70	ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG	991
	Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln	
	290 295 300	
75	ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC	1036
	Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly	
	305 310 315	
80	TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT	1081
	Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His	
	320 325 330	

	GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT	1126
	Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp	
	335 340 345	
5	GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC	1171
	Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn	
	350 355 360	
10	ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT	1216
	Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile	
	365 370 375	
15	GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT	1261
	Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn	
	380 385 390	
20	ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA	1306
	Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu	
	395 400 405	
	GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG	1351
	Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala	
	410 415 420	
25	TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC	1396
	Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr	
	425 430 435	
30	GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG CTG AAA CCG CCT	1441
	Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys Pro Pro	
	440 445 450	
35	AGC GCT GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA	1486
	Ser Ala Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro	
	455 460 465	
40	GTC GAC AAC TTC GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG CAG	1531
	Val Asp Asn Phe Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Gln	
	470 475 480	
	GTC GCC GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA	1576
	Val Ala Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly	
	485 490 495	
45	TGG GCT GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC	1621
	Trp Ala Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg	
	500 505 510	
50	TAC TCT GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC	1666
	Tyr Ser Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala	
	515 520 525	
55	TAC CCA GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC	1711
	Tyr Pro Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr	
	530 535 540	
60	ACT ATT GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC	1756
	Thr Ile Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser	
	545 550 555	
	ACT GAC AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC	1801
	Thr Asp Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp	
	560 565 570	
65	GAG GAC AAG AAG GGA CAC ATG GAC TTG GTC TGG GTG CTC TCC AGA	1846
	Glu Asp Lys Lys Gly His Met Asp Leu Val Trp Val Leu Ser Arg	
	575 580 585	

AGC ATG GTC CTT ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC 1891
 Ser Met Val Leu Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr
 590 595 600

5 CTT ATC GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT 1936
 Leu Ile Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser
 605 610 615

10 GAC TTC TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT 1981
 Asp Phe Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser
 620 625 630

CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAATAAGCTT 2009
 His Pro Gln Phe Glu Lys
 635

15

<210> 18
 <211> 2005 Basenpaare

20 <212> DNA
 <213> Fragment des Plasmids PBBP29

<220>
 <221> sig_peptid

25 <222> (22)...(84)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (85)...(1998)

30 <223> Fusionsprotein aus Mutein DigA16, Strep-Tag II, Verbindungspeptid
 Gly(5) und Alkalischer Phosphatase

<220>
 <221> CDS

35 <222> (85)...(606)
 <223> Mutein DigA16

<220>
 <221> CDS

40 <222> (607)...(636)
 <223> Strep-Tag II Affinitätsanhängsel

<220>
 <221> CDS

45 <222> (637)...(651)
 <223> Verbindungspeptid Gly-Gly-Gly-Gly-Gly

<220>
 <221> CDS

50 <222> (652)...(1998)
 <223> Alkalische Phosphatase ohne Signalsequenz und N-terminales Arg

<400> 18

	TCTAGATAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT						45
5				Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile						
				-21	-20					-15							
	GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG		90
	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val		
				-10					-5				-1	1			
10	TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC		135
	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe		
			5					10					15				
15	GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	CAG	GTC	GCC	GCG	TAC		180
	Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Gln	Val	Ala	Ala	Tyr		
			20					25					30				
20	CCC	GAT	CAT	ATT	ACG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC		225
	Pro	Asp	His	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr		
			35					40					45				
	ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	CGC	TAC	TCT	GTA	ATC		270
25	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Tyr	Ser	Val	Ile		
			50					55					60				
	CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	TCC	GAA	GGT	ACC	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT		315
	His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly		
			65					70					75				
30	GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	TAC	ACT	ATT	GGA	GGT		360
	Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Tyr	Thr	Ile	Gly	Gly		
			80					85					90				
35	GTG	ACC	CAG	GAG	GGT	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG		405
	Val	Thr	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys		
			95					100					105				
40	AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TTT	TGC	TCG	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG		450
	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys		
			110					115					120				
	GGA	CAC	ATG	GAC	TTG	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT		495
45	Gly	His	Met	Asp	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu		
			125					130					135				
	ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC		540
	Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser		
			140					145					150				
50	CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA		585
	Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu		
			155					160					165			</	

[illegible]

	470	475	480	
5	GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA 1575 Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu 485 490 495			
10	TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT 1620 Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly 500 505 510			
15	GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA 1665 Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln 515 520 525			
20	ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG 1710 Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu 530 535 540			
25	GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT 1755 Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala 545 550 555			
30	GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT 1800 Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala 560 565 570			
35	CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG 1845 Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met 575 580 585			
40	GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC 1890 Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr 590 595 600			
45	GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT 1935 Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn 605 610 615			
	GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA 1980 Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys 620 625 630			
	GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAAGCTT 2005 Ala Ala Leu Gly Leu Lys 635			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 March 1999 (1999-03-02), pages 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph ---	
A	WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8 April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims ---	
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 2000

Date of mailing of the international search report

30/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internr al Application No

PCT/DE 00/01873

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 318, 1996, pages 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6, left column; Fig. 4e); Table 2;</p>	
A	<p>SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 219, no. 3, 1994, pages 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 cited in the application figure 1</p>	
A	<p>WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27 July 1989 (1989-07-27) example 21</p>	
A	<p>EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15 April 1998 (1998-04-15) the whole document</p>	
P,X	<p>SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 297, no. 5, 14 April 2000 (2000-04-14), pages 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 the whole document</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01873

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9916873 A	08-04-1999	DE 19742706 A AU 1143799 A EP 1017814 A	15-04-1999 23-04-1999 12-07-2000
WO 8906698 A	27-07-1989	DE 3813278 A AT 87665 T DE 58903898 D EP 0324474 A ES 2054883 T HK 116996 A JP 7031194 B JP 1503647 T US 5702888 A US 5344757 A	20-07-1989 15-04-1993 06-05-1993 19-07-1989 16-08-1994 12-07-1996 10-04-1995 07-12-1989 30-12-1997 06-09-1994
EP 0835934 A	15-04-1998	DE 19641876 A	16-04-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01873

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BESTE GERALD ET AL: "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 5, 2. März 1999 (1999-03-02), Seiten 1898-1903, XP002150337 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 page 1903, left column; fourth paragraph ---	
A	WO 99 16873 A (SCHMIDT FRANK ;SKERRA ARNE (DE); BESTE GERALD (DE); STIBORA THOMAS) 8. April 1999 (1999-04-08) pages 5-15,39, claims --- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FLOWER D: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 318, 1996, Seiten 1-14, XP002095126 ISSN: 0264-6021 page 6 , left column; Fig. 4e); Table 2; ---</p>	
A	<p>SCHMIDT FRANK S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 219, Nr. 3, 1994, Seiten 855-863, XP002095123 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 ---</p>	
A	<p>WO 89 06698 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 27. Juli 1989 (1989-07-27) Beispiel 21 ---</p>	
A	<p>EP 0 835 934 A (INST BIOANALYTIK GMBH) 15. April 1998 (1998-04-15) das ganze Dokument ---</p>	
P,X	<p>SCHLEHUBER STEFFEN ET AL: "A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 297, Nr. 5, 14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 1105-1120, XP002150338 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument -----</p>	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01873

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9916873 A	08-04-1999	DE 19742706 A	15-04-1999
		AU 1143799 A	23-04-1999
		EP 1017814 A	12-07-2000
WO 8906698 A	27-07-1989	DE 3813278 A	20-07-1989
		AT 87665 T	15-04-1993
		DE 58903898 D	06-05-1993
		EP 0324474 A	19-07-1989
		ES 2054883 T	16-08-1994
		HK 116996 A	12-07-1996
		JP 7031194 B	10-04-1995
		JP 1503647 T	07-12-1989
		US 5702888 A	30-12-1997
		US 5344757 A	06-09-1994
EP 0835934 A	15-04-1998	DE 19641876 A	16-04-1998